

Elettroforesi ad alta risoluzione su siero di cani

O. ABATE, R. ZANATTA, T. MALISANO e U. DOTTA

Università di Medicina Veterinaria di Torino, Dipartimento di Patologia animale

I valori delle proteine del siero sono stati determinati in 26 cani sani usando l'elettroforesi con gel agarosio (SPE), ottenendo una separazione elettroforetica di 6 regioni: albumina α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e γ globuline.

E' stata usata l'elettroforesi ad alta risoluzione per separare le singole proteine. Le proteine del siero dei cani (26 sani e 20 affetti da varie malattie), sono poi state sottoposte ad immunofissazione (IFE) Sudan nero su pellicola HRE. L'emoglobina e il normale plasma canino sono state usate per identificare rispettivamente aptoglobina ed il fibrinogeno.

Nei campioni standard, determinati con HRE, sono state identificate le seguenti proteine: albumina, α_1 -lipoproteina (α_1 regione), aptoglobina e α_2 -macroglobulina (regione α_2), β -lipoproteina e C3 (regione β_1), transferrina e IgM (regione β_2), IgG (prevalentemente nella regione γ e in parte nella regione β_2). Il campione HRE presente nei cani sani può essere comparato a quelli dei cani affetti da varie malattie per ottenere informazioni cliniche.

Parole chiave: proteine del siero; elettroforesi; HRE: cane

INTRODUZIONE

Diversi fattori, incluse le malattie infettive e parassitarie, possono influenzare la mobilità delle singole proteine del siero, e una correlazione tra il profilo delle proteine del siero e varie malattie è stata dimostrata in umani e in animali domestici. (Keay, 1982; Trumel et al., 1996).

Durante gli ultimi due decenni c'è stato un aumento nell'applicazione dell'elettroforesi come test di laboratorio rapido in campo veterinario. I profili delle proteine del siero sono definiti usando l'elettroforesi di routine (SPE), che permette l'identificazione di cinque o sei frazioni o regioni, ognuna composta da diverse proteine. Recentemente l'elettroforesi ad alta risoluzione ha avuto varie conferme ed è stata usata in medicina umana.

Questo metodo è caratterizzato da una migliore risoluzione rispetto all'SPE e permette la separazione delle frazioni delle singole proteine che compongono una regione elettroforetica (per esempio aptoglobina, α_2 -lipoproteina e α_2 macroglobulina per la regione α_2). La separazione ed identificazione delle singole proteine facilita la valutazione dei cambiamenti patologici indotti da varie malattie (Aguzzi, 1980; Gallina et al., 1994).

La letteratura suggerisce grande variabilità nei valori delle proteine elettroforetiche nei cani (Amog et al., 1977; Keay, 1982; Keay & Doxey, 1982; Kaneko, 1989; Sevelius & Andersson, 1995). Noi perciò abbiamo cercato di ottenere valori normali più precisi per le proteine di siero canino usando l'elettroforesi con gel di agarosio (SPE) e applicando HRE per separare la maggior parte delle proteine che compongono una specifica regione elettroforetica.

L'obiettivo della ricerca è stato quello di usare HRE e di identificare le frazioni delle singole proteine che costituiscono una determinata regione proteica.

MATERIALI E METODI

Animali

Sono stati raccolti 26 campioni di siero da 26 cani clinicamente normali, di varia razza, età e sesso e da 20 cani, di varia razza, età e sesso, ma che erano affetti da varie malattie e con bande proteiche che dimostravano aumenti in alcune regioni del tracciato elettroforetico. I sieri patologici sono risultati utili ed hanno fornito una visione migliore di alcuni tracciati proteici. (per esempio le immunoglobuline in sieri di cani affetti da erlichiosi e leishmaniosi). I sieri sono stati raccolti dopo la centrifugazione del sangue a 1500 rpm per 10-15 minuti. I campioni di siero sono stati usati freschi o dopo la conservazione a -20°C per meno di 12 mesi. I sieri emolitici sono stati scartati.

Metodi

Le concentrazioni totali delle proteine del siero sono state determinate usando un rifrattometro Goldberg American Optical . L'elettroforesi con gel di agarosio (SPE) è stata realizzata applicando 100 V per 27 minuti, con un kit Beckman SPE Paragon (Beckman Instruments Inc.). L' HRE è stata realizzata con gel di agarosio, applicando 200 V per 60 minuti, sempre con kit Paragon Beckman HRE. Quando possibile, le bande di singole proteine che formavano le diverse regioni elettroforetiche, sono state identificate usando l'immunofissazione elettroforetica (IFE), un metodo altamente specifico. Quando gli antisieri non erano commercialmente disponibili, sono stati impiegati metodi alternativi, che erano già stati applicati in medicina umana .(Amog et al., 1977; Sevelius & Andersson, 1995). L' IFE, riconoscimento di una singola proteina tramite aggiunta di un anticorpo specifico al substrato di gel di agarosio dopo migrazione elettroforetica, è stata usata per identificare la localizzazione esatta delle proteine su tracciati normali. Sono stati usati i seguenti antisieri: transferrina capra anti-cane, capra anti-cane C3, coniglio anti-cane IgM- .catena specifica, coniglio anti-cane IgG catena pesante e leggera (tutti dei Laboratori Bethyl Inc.) . I sieri sono stati diluiti 1/10-1/40 per evitare un eccesso di antigene in moso da evitare la precipitazione del complesso Ag-Ab e limitare l'amplificazione colorimetrica causata dalla alta affinità del complesso Ag-Ab. L'identificazione delle lipoproteine è stata realizzata con il nero Sudan, colorazione specifica di lipidi, usando un kit Beckman LIPO su pellicole HRE (Beckman Instruments Inc.). L'identificazione di fibrinogeno, una proteina del plasma assente nel siero è stata realizzata paragonando la contemporanea migrazione dei campioni di plasma e siero nello stesso cane, come riportato da Amog et al. (1977).

L'emoglobina è stata ottenuta da campioni di sangue raccolti usando EDTA come anticoagulante. Dopo la centrifuga a 1500 rpm per 15 minuti, la parte corpuscolata è stata risospesa in soluzione salina (1.5 mL/mL packed cell) e il procedimento è stato ripetuto cinque volte. Gli eritrociti liberi da impurità sono stati congelati a -72°C per 30-40 minuti e scongelati per assicurare emolisi completa (Amog et al, 1977). La migrazione elettroforetica dell'emoglobina pura e dei campioni di siero è stata realizzata per verificare la localizzazione di questa proteina (Amog et al., 1977). La capacità dell'aptoglobina di legarsi saldamente all'emoglobina in vitro è stata usata per identificare questa proteina. L'aggiunta di emoglobina al campione di siero ha indotto la formazione del complesso emoglobina-aptoglobina (Hb-Hp), che migra più lentamente rispetto all'aptoglobina pura e ne permette il pronto isolamento. (Amog et al., 1977 ; Sevelius & Andersson, 1995).

Le separazioni SPE sono state analizzate con un metodo quantitativo usando un densitometro scanning Beckman Appraise Junior. Le deviazioni standard sono state ottenute con analisi statistiche (Tallarida & Murray, 1987). Le separazioni HRE sono state analizzate qualitativamente attraverso ispezione visiva dei tracciati. (Ferrari,1994)

RISULTATI E DISCUSSIONE

Elettroforesi normale (SPE)

I bassi valori ottenuti dai cani sani sono illustrati nella Tabella 1. Il grafico elettroforetico è stato diviso in sei regioni secondo i metodi precedentemente descritti (Breitschwerd et al., 1987; Harrus et al., 1996; Trumel et al., 1996). I risultati erano in accordo con quanto riportato precedentemente.

Elettroforesi ad alta risoluzione (HRE)

Il saggio HRE ha permesso la separazione di diverse bande di proteine da ogni singola regione individuata tramite SPE. Colorazione con Paragon Blue Staining e un tempo di migrazione di 60 minuti, con un tracciato elettroforetico di 6-7.5 cm, ha dato la miglior risoluzione per ogni proteina eccetto che per la lipoproteina alla quale il Paragon Viola mostrava più affinità (fig. 1). Le proteine riconoscibili con HRE sono state identificate qui di seguito.

Tavola 1 (fine pag 155)

Separazione elettroforetica di proteine del siero di cani normali. I risultati sono riportati come

Deviazione standard n=26

Albumina	3.23 +/- 0.29 g/dl
Alfa-1 globulina	0.77 +/- 0.15 g/dl
Alfa-2 globulina	0.54 +/- 0.17 g/dl
Beta-1 globulina	0.88 +/- 0.29 g/dl
Beta-2 globulina	0.76 +/- 0.21 g/dl
Gamma globulina	0.62 +/- 0.19 g/dl
Proteine Totali	6.86 +/- 0.55 g/dl

Albumina

La proteina è stata facilmente identificata poiché appare come una spessa banda corrispondente alla sua alta concentrazione di siero, carica elettrica omogenea e una elevata affinità al colorante. La sua localizzazione è la più anodica perché, a differenza che negli umani, la prealbumina (ancora più anodica) non esiste (Kaneko, 1989). Sebbene fosse possibile osservare alterazioni nella concentrazione di siero albumina (ipoalbuminemia), non abbiamo trovato nessun caso di bis albuminemia.

α .lipoproteine

Queste sono state identificate con colorazione mediante Sudan nero. È generalmente riconosciuto che, a differenza che negli umani, la zona α_1 è quantitativamente più rappresentata dalla lipoproteina sia nei cani che nei bovini (Medaille et al., 1988; Dotta et al., 1994) (Fig. 2). L' α_1 lipoproteina produce una zona diffusa nei tracciati HRE tra l'albumina e altre proteine della regione α_1 , in particolare l' α_1 -antitripsina. Ciò può essere attribuito alle sue cariche elettriche meno omogenee e alla sua scarsa affinità al colorante. L' α_2 -lipoproteina (chiamata pre β lipoproteina) è meno rappresentata e localizzata in una posizione catodicamente vicino all' α_2 macroglobulina (Groulade, 1985b).

α_1 .antitripsina

La localizzazione dell' α_1 antitripsina non è stata identificata in quanto l'antisiero specifico non era disponibile a livello commerciale. Come già riportato da Sevelius ed Andersson (1995), è situata in una posizione più catodica rispetto alla α_1 .lipoproteina (Fig.8).

Aptoglobina

Questa proteina è localizzata nella regione α_2 ed appartiene al gruppo delle proteine della fase acuta, la cui sintesi si accresce rapidamente durante l'infiammazione. L'aptoglobina libera si trova nella posizione più anodica della regione α_2 . La sua localizzazione, nella separazione HRE, è stata indirettamente identificata sulla base del suo forte legame con l'emoglobina. In vitro, l'aggiunta di emoglobina libera ad un campione di siero provoca la precipitazione del complesso Hb-Hp, che si trova nella regione α_2 con mobilità ridotta. (Amog et al., 1977; Sevelius & Andersson, 1995). A seconda del tipo di proteina in eccesso (per esempio l'aptoglobina nei sieri patologici o l'emoglobina nei sieri emolitici) è stato possibile individuare un altro legame proteico più anodico o catodico rispetto al legame del complesso Hb-Hp (Fig. 3)

L'identificazione del complesso Hb-Hp può essere utile per evitare possibili incomprensioni dovute all'aumento di regione α_2 in sieri emolitici.

Aumenti di aptoglobina sono visibili in cani colpiti da malattie emolitiche o da diabete (Van der Broek, 1992) o dopo la somministrazione di prednisone (Harvey & West, 1987)

Emoglobina

Secondo le osservazioni di altri autori (Amog et al., 1977; Sevelius & Andersson, 1995), abbiamo riscontrato che l'emoglobina libera, presente nei sieri emolitici, migra lentamente nella regione β_1 (Fig. 3)

α_2 . macroglobulina

L'HRE ha rivelato due bande distinte nella regione α_2 . Quella più anodica è l'aptoglobina. La banda più catodica è stata identificata come α_2 .macroglobulina (Fig. 8). Negli umani, la concentrazione di questa proteina aumenta durante le infiammazioni e malattie necrotiche, neoplasia, necrosi ischemica ed ustioni.

L'alterazione della concentrazione di α_2 macroglobulina può indicare malattie latenti o subcliniche, infezioni croniche o tumori. L'entità di queste alterazioni può essere usata come indicatore del grado di danno al tessuto dovuto alla malattia (Ciampi et al., 1979). Nei cani, la α_2 .macroglobulina è una proteina di reazione in fase acuta e la sua concentrazione aumenta in tutti i tipi di malattie del fegato (Sevelius & Andersson, 1995) e durante le malattie renali (per esempio, la glomerulonefrite) (Groulade, 1985a; Kaneko, 1989)

β .lipoproteine

Come riportato nei bovini (Dotta et al., 1994) le β lipoproteine nei cani sono meno rappresentate che le α .lipoproteine. Inoltre, è difficile identificare le β lipoproteine, senza un colorante specifico (per es. nero Sudan, Fig. 2). Noi abbiamo identificato le β lipoproteine usando il Paragon Blu e Viola (Fig. 1) come uno sfondo diffuso o una banda definita in modo leggermente irregolare tra le regioni α e β (inter alpha-beta)

C3 (complemento)

La localizzazione del C3 è stata identificata dall'IFE (Fig. 4). La proteina era caratterizzata da mobilità beta e, a differenza degli umani e dei bovini, da una posizione più anodica che la transferrina. Nei sieri freschi, è stata osservata una banda singola, mentre in campioni conservati (3-4 mesi a -20°C), compaiono due bande leggere, che rappresentano i prodotti di degradazione del complemento.

Transferrina

La transferrina è stata identificata dall'IFE come proteina che limita le regioni β e γ . Usando l'HRE, si notano due bande distinte (Fig.4). Nei bovini, questa proteina genera fino a sei diverse bande ed è caratterizzata da polimorfismo genetico (Dotta et al.,1994)

Fibrinogeno

Nei tracciati di plasma, il fibrinogeno è stato riscontrato nella regione β , tra le due bande di transferrina, che hanno impedito la loro identificazione (Fig. 5). Tracce di fibrinogeno possono anche apparire in un campione che non è completamente coagulato (Ferrari,1994)

Immunoglobuline

IgM- Nonostante l'uso di antisiero specifico, è stato difficile rintracciare le IgM, anche in sieri patologici, dove esse raggiungono concentrazioni più alte per un periodo molto breve, essendo rapidamente sostituite dalle IgG. In sieri normali esse appaiono come una banda leggermente omogenea, poco definita, identificato con l'IFE e localizzata tra le regioni β_1 e β_2 .

IgG- Durante alcuni processi patologici l'IgG è l'immunoglobulina che si altera di più. L'elettroforesi è molto utile per valutare gli aumenti monoclonali o policlonali delle IgG: Nelle gammopatie monoclonali, nella regione γ , o in aree più catodiche della regione β_2 , le γ .globuline sono identificabili come una banda proteica ristretta, più densamente colorata.

L'HRE permette di evidenziare le singole proteine associate con gammopatie monoclonali o oligoclonali, come in cani affetti da mieloma multiplo e macroglobulinemia, in alcuni casi di malattie linfoproliferative (linfosarcoma e leucemia linfatica) ed occasionalmente durante la fase cronica dell'erlichiosi (Forrester & Redford, 1992; Dorfman & Diminski, 1992,) di essere separate (Fig.6) ed identificate tramite IFE (Fig. 7). Al contrario, nella gammopatia policlonale, caratterizzata dalla intensificazione diffusa della colorazione dalla regione β_2 alla regione γ , l'IFE non fornisce ulteriori precise indicazioni.

CONCLUSIONI

Le più importanti proteine rilevate dall'HRE sono state identificate in questo studio, usando l'IFE ed altri metodi specifici (Fig.8). Poiché gli antisieri specifici non erano disponibili a livello commerciale, la α_1 antitripsina è stata localizzata usando rapporti di studi precedenti nei cani (Amog et al., 1997; Sevelius & Andersson, 1995) e in umani (Aguzzi, 1980)

Il metodo HRE fornisce una risoluzione migliore rispetto allo SPE, permettendo perciò l'identificazione e risoluzione di singole proteine che sono incluse in una regione elettroforetica SPE. Alla luce del ruolo fisiopatologico giocato da queste proteine, potremmo ottenere ulteriori informazioni cliniche dall'analisi di una separazione elettroforetica. Il tracciato HRE presente in cani sani potrebbe essere paragonato con quello di cani affetti da varie malattie per identificare possibili modificazioni quantitative (Aumento o decremento dell'intensità della colorazione) o qualitative (comparsa di uno o più bande, di solito assenti) .

Il prossimo passo nella ricerca sarà di valutare l'applicazione pratica dell'HRE in casi individuali

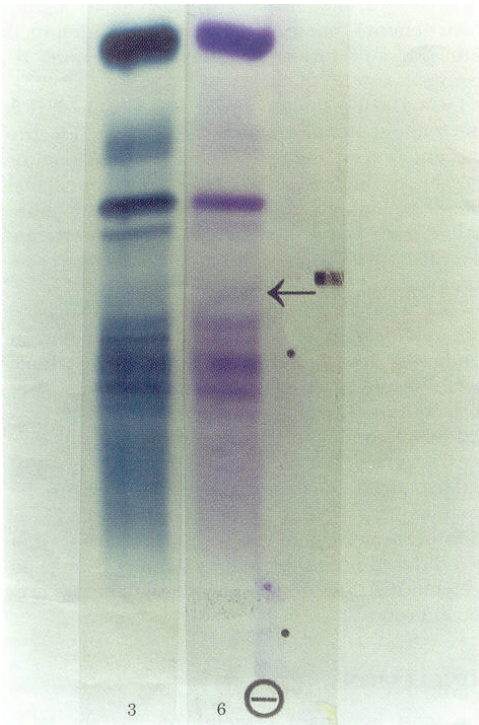


FIG 1

Campioni di siero canino. Campione 3, colorato con Paragon. Blu; campione 6, colorato con Paragon Violetto:
Le lipoproteine sono più evidenti dopo la colorazione con Paragon Viola (freccia ←)

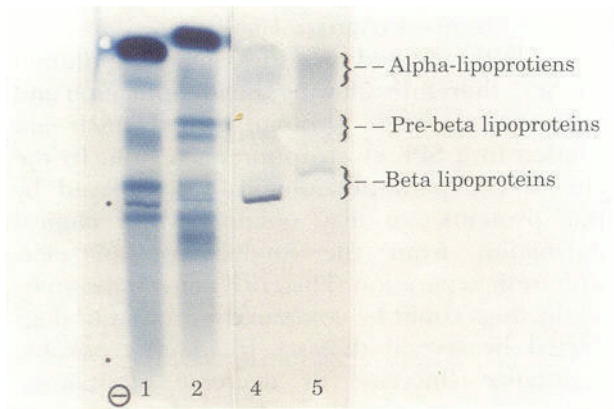


FIG 2

Localizzazione di lipoprotine: Traccia 1. campione di siero umano colorato con Paragon Blu; traccia 4, lo stesso campione, colorato con Sudan nero; Le lipoproteine, con la predominanza della frazione B, sono riconoscibili:
Campione 2, siero canino colorato con Paragon Blu; campione 5, stesso campione colorato con Sudan nero: Le bande delle lipoproteine (α , pre β e β) sono riconoscibili, soprattutto le α_1 .

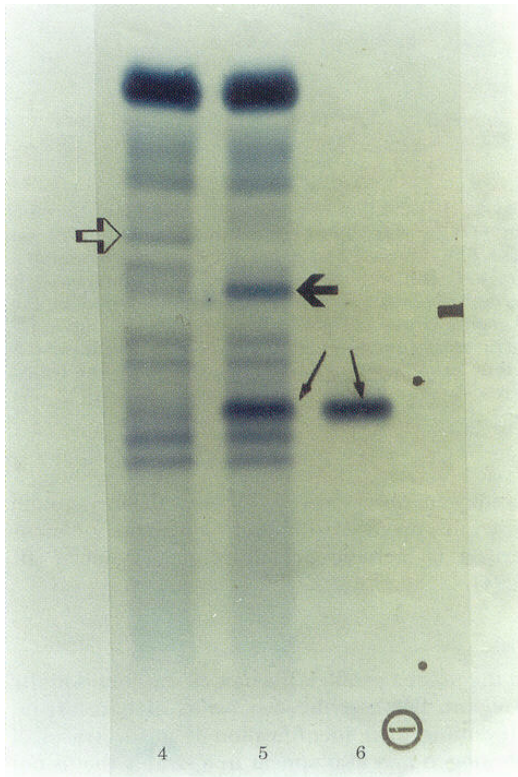


FIG 3

Localizzazione dell'aptoglobina (Hp) ed emoglobina (Hb).
 Campione 4, siero canino con una piccola quantità di aptoglobina (freccia \rightarrow); campione 5, stesso campione di siero con emoglobina libera aggiunta: scomparsa dell'Hp, comparsa del complesso Hp-Hb, una banda è localizzata nella regione α_2 (freccia \blacktriangleright). L'emoglobina in eccesso è riconoscibile nella regione β_1 (freccia piccola \blacktriangleright): Campione 6, HRE di Hb libera, che dà una banda singola localizzata nella regione β_1 (freccia \leftarrow)

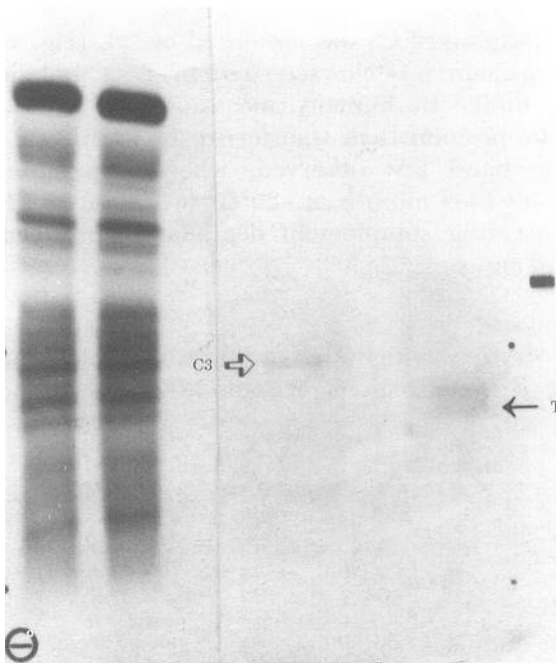


FIG 4

Localizzazione del complemento (C3) e transferrina (Tf) con immunofissazione (IFE) su pellicola HRE. Campioni 1 e 2; siero di cani sani. Campione 4 IFE con antisiero anti-C3: Il complemento è riconoscibile come una banda localizzata nella regione B1 (freccia \rightarrow) Campione 6, IFE con antisiero anti transferrina. L'aptoglobina è riconoscibile come due bande localizzate nella regione β_2 (freccia \leftarrow)

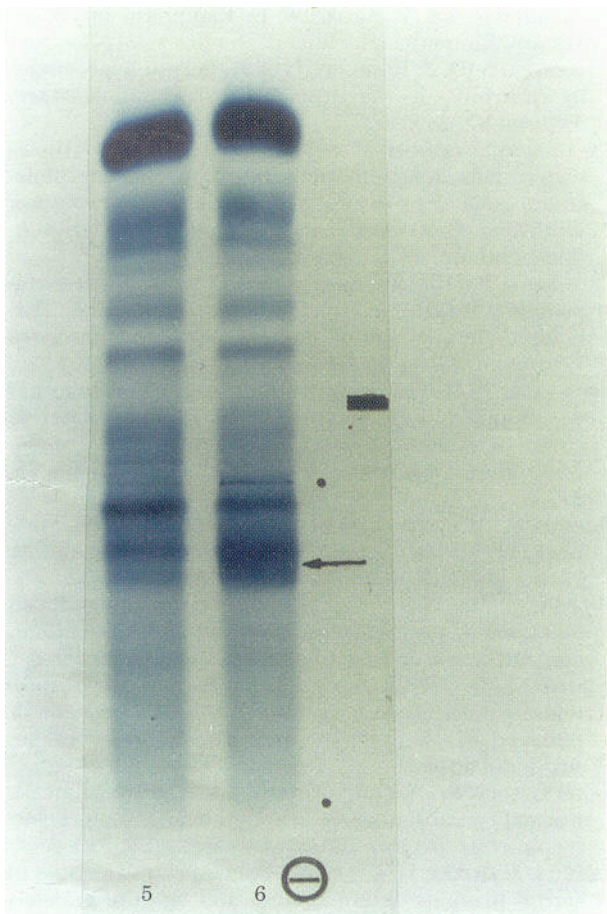


FIG:5

Identificazione di fibrinogeno: Campione 5, campione di siero; Campione 6 , plasma degli stessi cani. Il fibrinogeno, localizzato tra le due bande di transferrina, è facilmente riconoscibile nella regione β_2 (freccia ←)

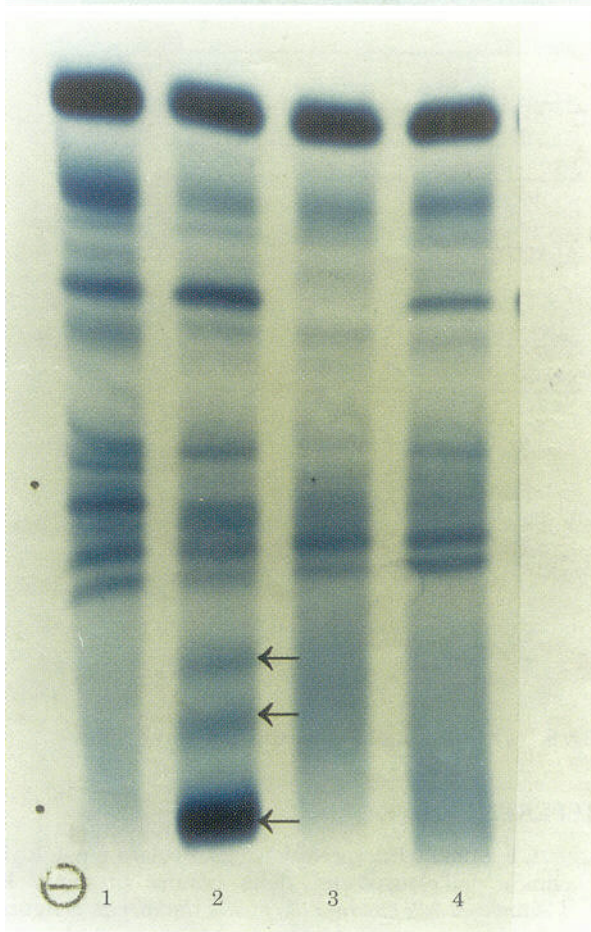


FIG.6

Campione 1, siero di cane sano. Campione 2, siero di cane affetto da erlichiosi e leishmaniosi, tre bande diverse (←) sono riconoscibili nella regione γ (vd fig. 7 per IFE) Tracce 3 e 4, campioni di siero di cani con aumenti monoclonali di immunoglobuline, l'intensificazione del colore nella regione γ è dovuta all'infezione da leishmaniosi

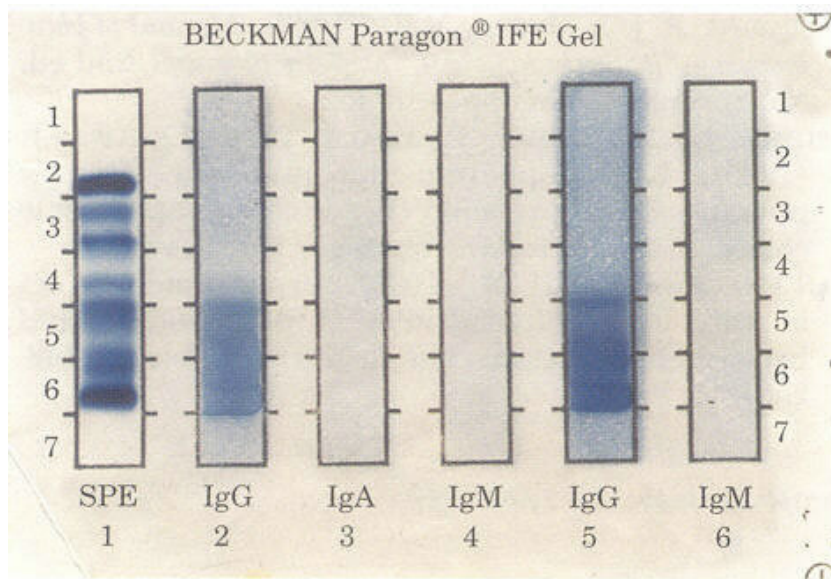


FIG: 7

Identificazione di IgG tramite IFE da striscia SPE. Campione 1, siero di cane affetto da erlichiosi e leishmaniosi: Campione 2, IFE con antisiero anti-IgG (1/40), le immunoglobuline sono localizzate nelle regioni β_2 e γ ; campione 5, lo stesso siero con antisiero meno diluito (1/20): Campioni 4 e 6, IFE con antisiero anti-IgM (due diverse diluizioni: 1/40 – 1/20), le immunoglobuline non sono identificabili: Campione 3, IFE con antisiero anti-IgA, le immunoglobuline non sono identificabili.

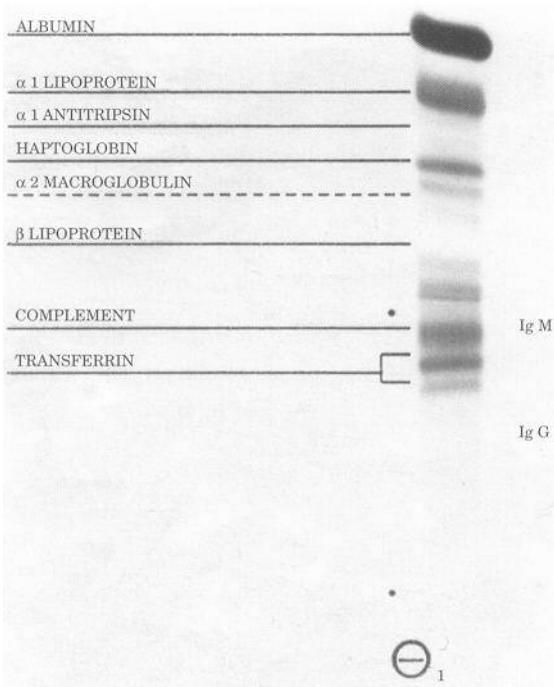


FIG:8

Profilo HRE di siero proteico di un campione di cane sano