

Dal meeting

"Le proteine dal Laboratorio alla clinica"

X edizione - Castrocaro, 24 - 26 ottobre 2001

CEFAR – Centro Europeo per la Formazione e la Ricerca in Scienze Sanitarie e in Biotecnologie
SIBioC – Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica

Ricerca delle Catene Leggere Libere (FLC) Monoclonali e Policlonali nelle urine

José A Viedma C

Hospital General & Unversitario – Elche (Alicante) Spain

Indice

- ❑ Scopo dello studio
- ❑ Campioni e Metodi
- ❑ Risultati
- ❑ Tabelle e Figure

Scopo dello studio

Lo scopo di questo studio è stato di determinare se la determinazione nefelometrica delle FLC può essere utilizzata per migliorare la ricerca delle FLC monoclonali.

Campioni e Metodi

Sono stati studiati campioni di urine di 300 pazienti. È stata analizzata l'escrezione delle Catene Leggere Libere delle Immunoglobuline (FLC) di pazienti con:

- gammopatia monoclonale e
- con proteinuria

utilizzando metodi elettroforetici di buona qualità – elettroforesi ad alta risoluzione su gel di agarosio (HRE) e immunofissazione (IFE) – su campioni concentrati.

In aggiunta abbiamo utilizzato una determinazione Nefelometrica delle FLC su campione urine non concentrato (IN-FLC) (Kit codice: K.BNA.FRK.FRL – New Scientific Company, Cormano (MI); Nefelometro BNII – Dade Behring).

Risultati

Risultati complessivi della IFE

Con la IFE abbiamo trovato:

- 147 FLC monoclonali (BJP) in 135 campioni (12 campioni avevano entrambi i tipi BJP-Kappa e BJP-Lambda).
- 166 urine con FLC policlonali con pattern "ladder".
- La contemporanea presenza di FLC monoclonali e policlonali è stata osservata in 86/135 urine (64% di casi BJP).
- Immunoglobuline intatte (Ig) sono state trovate associate con la presenza di BJP in 79/135 (58,5%) distribuite come segue: Ig policlonali in 33 casi, Ig monoclonali in 28 casi, e entrambe Ig mono e policlonali in 18 casi.

Performance analitiche della Nefelometria

FLC

La performance analitica del metodo nefelometrico per la valutazione delle FLC in urine è stata buona:

- a. campione: urina non concentrata, tubo primario, identificazione bar code
- b. limite di rilevazione vicino a 2,5 mg/L
- c. no eccesso di antigene (testato fino a 50.000 mg/L)
- d. no cross reazione con Ig intatte
- e. recupero analitico vicino al 100% sia per le FLC monoclonali sia per FLC policlonali
- f. buona precisione
- g. i dati preliminari suggeriscono il parallelismo nelle curve dose-risposta nel range analitico (da 5,0 a 80 mg/l) per le FLC sia monoclonali sia policlonali.

Confronto Nefelometria FLC / IFE – Sensibilità di rilevazione delle FLC

Nonostante le buone performance che caratterizzano il metodo nefelometrico per la valutazione delle FLC delle Immunoglobuline il metodo ha mostrato dei limiti:

a. FLC-kappa (Tabella 1)

Con la nefelometria, abbiamo trovato FLC kappa <2,5 mg/L in 69/300 (23%) delle urine, essendo con la IFE 10/69 (14,4%) campioni positivi per BJP kappa e 16/69 (23,1%) campioni positivi per ladder. La percentuale di falsi negativi per FLC kappa Monoclonali & Policlonali è stata 26/69 (37,7%).

Per la IFE i campioni con FLC Monoclonali kappa furono **concentrati 400 volte** in accordo con la bassa concentrazione di proteine totali delle urine.

Con la nefelometria abbiamo trovato FLC sui campioni concentrati.

b. FLC-lambda (Tabella 2)

Con la nefelometria, FLC-lambda <2,5 mg/L furono trovate in 160/300 (53,3%) delle urine, essendo con la IFE 15/160 (9,4%) campioni positivi per FLC Monoclonali lambda e 14/160 (8,7%) per ladder.

Per la IFE i campioni con FLC Monoclonali lambda furono **concentrati tra 50 e 400 volte** in funzione del relativo contenuto di proteine delle urine.

Anche per FLC lambda con la nefelometria abbiamo trovato FLC sui campioni concentrati.

FLC Monoclonali e Policlonali

Il metodo nefelometrico FLC ha mostrato una certa mancanza di sensibilità nel differenziare tra FLC monoclonali e policlonali in un ampio range di valori (tra 2,5 mg/L e 100 mg/L). In sintesi:

FLC Policlonali: (Fig. 1, 3, 5, 6)

- a. è un reperto comune nella proteinuria
- b. sono un marker di risentimento tubulare
- c. mostrano importante variazione in concentrazione (andando da < 2.5 mg/L fino a 100 mg/L)
- d. il pattern ladder kappa fu presente nel 60% dei casi
- e. il pattern ladder lambda è stato trovato nel 24% dei casi
- f. l'associazione tra FLC monoclonali e policlonali è relativamente frequente (60% dei casi BJP)

FLC Monoclonali: (Fig. 2, 4, 5, 6)

- a. similmente alle FLC policlonali mostrano una ampia distribuzione della concentrazione
- b. nell'80-90% dei casi la concentrazione di FLC monoclonali fu < 100 mg/L
- c. vi è una sovrapposizione con le FLC policlonali fino a > 100 mg/L
- d. una concentrazione di FLC kappa superiore a 250 mg/L suggerisce fortemente la monoclonalità

Rapporto FLC-κ/FLC-λ

L'uso del rapporto FLC-κ/FLC-λ aumenta leggermente la capacità di rilevare la monoclonalità delle FLC:

- a. Valori del rapporto FLC-κ/FLC-λ <1.0 indicano la monoclonalità delle FLC lambda
- b. Valori di FLC-κ/FLC-λ >4.0 suggeriscono la monoclonalità delle FLC kappa

Comunque la sensibilità per la evidenziazione dalla monoclonalità è relativamente bassa: (Fig. 7)

- a. con un valore di cut-off del rapporto FLC-κ/FLC-λ >4.0 la monoclonalità kappa è stata trovata solo nel 46,5% dei casi di BJP kappa.
- b. con un cut-off del rapporto FLC-κ/FLC-λ <1.0 la monoclonalità lambda è stata trovata nel 60% dei casi di BJP lambda.

L'inserto del kit chiaramente afferma che lo scopo del kit non è la differenziazione tra FLC monoclonali e policlonali ma la valutazione quantitativa della concentrazione urinaria di FLC.

Altri dati

In 64 urine entrambe le FLC kappa e lambda furono < 2.5 mg/L. In 32/64 casi (50%) noi non abbiamo potuto dimostrare FLC con la IFE.

In 129 casi entrambe kappa e lambda erano > 2.5 mg/L. In 12/129 casi con la IFE non abbiamo potuto dimostrare FLC ladder e/o monoclonali.

Tabelle e Figure

Table 1 Samples IFE positive Kappa					
Urine Total Protein mg/L	Nephelometry free Kappa < 2,5 mg/L Unconcentrated urines	IFE Results			
		Samples Concentration	Monoclonal Kappa	Monoclonal K + Polyclonal K	Polyclonal K
100	32	x 400	4	5	7
150	5		1	0	3
200	2		0	0	0
250	1		0	0	0
500	8		0	0	1
1000	13		0	0	4
2000	3		0	0	0
5000	5		0	0	1
> 5000	0		0	0	0
	69			5	5

Table 2 Samples IFE positive Lambda					
Urine Total Protein mg/L	Nephelometry free Lambda < 2,5 mg/L Unconcentrated urines	IFE Results			
		Urines Concentration	Monoclonal Lambda	Monoclonal L + Polyclonal K	Polyclonal L
100	59	from x 400 to x 50	2	4	6
150	20		1	2	4
200	11		1	1	0
250	5		0	1	1
500	20		1	1	1
1000	26		0	1	2
2000	11		0	0	0
5000	8		0	0	0
> 5000	0		0	0	0
	160			5	10

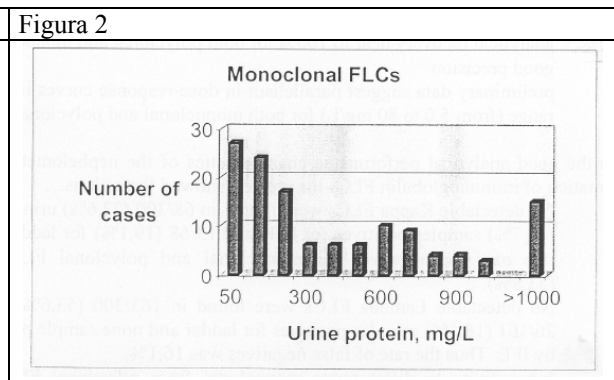
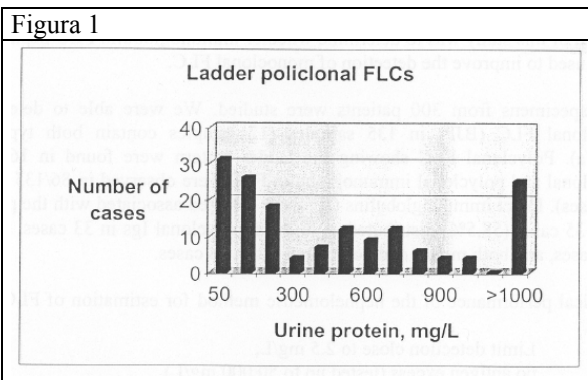


Figura 3

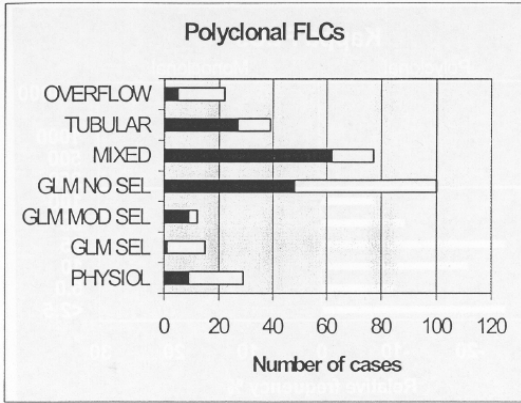


Figura 4

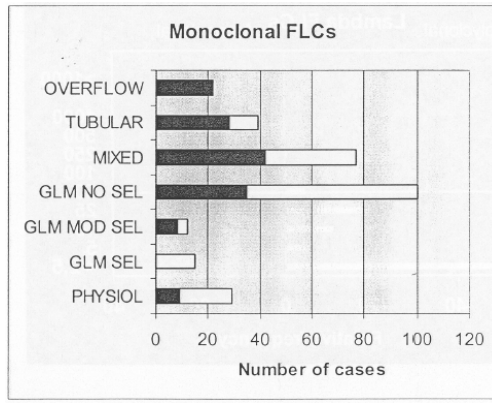


Figura 5

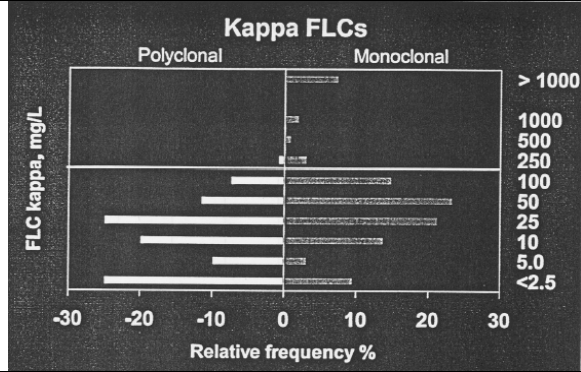


Figura 6

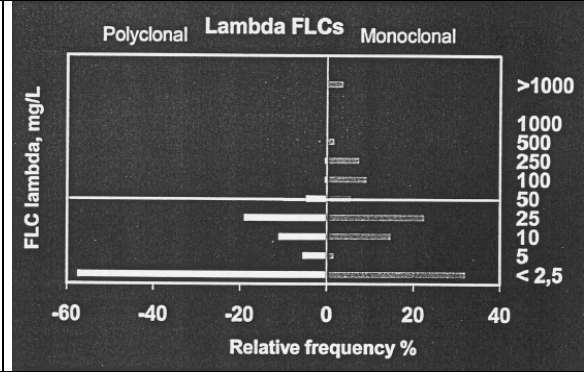


Figura 7

