

Cormano, 30 de Mayo de 2001

Apreciada Doctora  
Maristella Graziani  
Comisión Proteínas SIBioC

Objeto: [Documento “Linee guida per la ricerca della Proteina di Bence Jones” – Internet SIBioC](#)

Distinguida Doctora:

Me permito dirigirle a usted, que será portavoz del Grupo SIBioC también en Castrocaro, algunas de mis perplejidades sobre el contenido del Documento, perplejidades por otra parte que ya les constan a usted y al Grupo, además del punto a), que ya fué discutido en el encuentro de Rimini del pasado año. Para comodidad en las referencias le adjunto una [copia del Documento con las líneas numeradas](#).

a) Línea 57 – a propósito de los métodos inmunoquímicos

*“Los métodos cuantitativos inmunoquímicos no son aconsejables por las siguientes razones (10,11):”*

Ante todo, los artículos citados en apoyo de la tesis expresada en el Documento no me parece que la apoyen, es más, sostienen exactamente lo opuesto, en especial y de manera explícita Boeghe en sus conclusiones, pero también Tyllier en el artículo citado y en otro, suyo y de otros, del J Clin Pathol del '91.

Me gustaría disponer de sus consideraciones al respecto.

Substancialmente, es necesario precisar:

1. El test inmunoquímico (inmunoprecipitación en fase líquida tanto con reactivos anti Cadenas Ligeras Totales como con anti Libres), si bien es cierto que tiene características cuantitativas, tiene sobre todo un valor cualitativo puesto que expresa en cualquier caso una “señal de positividad” (o “señal de anormalidad”, que, para los kits comerciales, es prácticamente lo mismo en el caso de las Cadenas Ligeras Libres en orina) que estará ligada a la sensibilidad (entendida como límite discriminante entre positivo y negativo), y esto es, desde el punto de vista lógico, perfectamente análogo a lo que sucede con la EF y/o la IFE donde la “señal de positividad” (o “señal de anormalidad”) viene dada por la banda coloreada. Así pues, en la comparación de los tres métodos: EF, IFE, e Inmunoquímico, será necesario distinguir siempre entre prestaciones cualitativas y cuantitativas de cada método, teniendo en cuenta que, cuando por cualitativo se entiende la presencia o ausencia de una señal específica, inmediatamente se entiende presencia o ausencia de una cierta cantidad que genera esa señal.

2. Línea 58

*“en el aspecto cuantitativo, los antisueros no discriminan entre cadenas ligeras monoclonales y policlonales”*

Completamente de acuerdo; los métodos inmunoquímicos informan sólo de si hay una cierta cantidad de Cadenas Ligeras y de su tipo (kappa, lambda, ambas). En el diagnóstico de las BJP pueden ser empleados siempre teniendo en cuenta que sobre los positivos al test inmunoquímico se efectue una EF o la IFE para tener información sobre la mono o policlonalidad.

3. Línea 60

*“el antígeno usado como calibrador es policlonal y por ello distinto del de la muestra que es monoclonal; consiguientemente falta el requisito esencial para la exactitud de un test inmunológico es decir el paralelismo entre los antígenos del calibrador y los antígenos de la muestra”*

De acuerdo, pero en primer lugar este aspecto es relevante sólo desde el punto de vista cuantitativo y no desde el punto de vista positivo/negativo, en segundo lugar se trata de la misma falta de paralelismo que afecta a la determinación de las Ig monoclonales en suero y de las relativas kappa y lambda y consecuentemente, de la relación kappa/lambda, determinaciones que sin embargo están ampliamente difundidas en la práctica.

De cualquier manera mi opinión es que, para las BJP, EF e IFE no pueden ser consideradas “mas exactas” que las técnicas inmunoquímicas. Por lo tanto este criterio no debería ser empleado para desaconsejar el uso de estas en favor de aquellas.

4. Línea 63

*“la proteína de BJ puede estar presente en cantidades tan elevadas como para dar problemas de exceso de antígeno”*

Es cierto, pero también aquí, la situación es análoga a la de las Ig monoclonales en suero; además existen métodos y analizadores preparados para no incurrir en este problema. Para los analizadores no preparados hará falta distinguir entre “exceso absoluto”, es decir cuando una muestra muy alta resulta falsamente negativa y “exceso relativo”, es decir cuando una muestra muy alta resulta más baja de lo que debería. Esta última situación tiene solo valor cuantitativo, mientras la primera es evitable, por lo que es posible saber, con un oportuno diseño.

5. Línea 65

*“la proteína de BJ está a menudo presente en forma de agregados de dimensiones variables, lo que puede hacer la medida inmunoquímica poco repetible.”*

Cierto, pero este fenómeno tiene importancia sólo desde el punto de vista cuantitativo y no desde el punto de vista positivo/negativo.

Por otra parte la EF (y consiguientemente también la IFE) sufren interferencias por la misma causa: una banda o dos o tres, agravadas por el hecho de que la sensibilidad de las técnicas electroforéticas para evidenciar una cierta cantidad de proteína disminuye a medida que aumenta la superficie (o mejor el volumen) sobre el que se distribuye esa cantidad. En otras palabras, si en la EF (o la IFE) vemos una banda, no está dicho que seamos capaces de ver esa misma cantidad de proteína cuando se distribuya en dos o tres bandas.

b) Línea 38 – a propósito del método a emplear

*“Así pues deberá ser efectuada una inmunofijación ...”*

El documento del Grupo SIBioC sugiere la IFE como único método para la búsqueda cualitativa de la BJP.

1. El documento no aclara si la IFE que se sugiere es una de entre las comercialmente disponibles o es “home made”.
2. Los Grupos Forli y Liguria han evidenciado que la IFE efectuada con los kits comerciales en uso en los Laboratorios participantes, por lo menos en las muestras examinadas, aunque esto es ya suficiente, ha demostrado tener una sensibilidad inferior a la de los métodos inmunonefelométricos e inmunoturbidimétricos, pero sobre todo una reproducibilidad interlaboratorio insatisfactoria incluso a paridad de método.

c) Línea 44 – a propósito de los antisueros anti Cadenas Ligeras

*“Los antisueros a emplear son anti  $\kappa$  y anti  $\lambda$  totales con el añadido del antisuero anti cadenas pesadas de la inmunoglobulina presente en el suero según el esquema de la Fig. 1.*

*Los antisueros anti cadenas ligeras libres no son aconsejables dado que a menudo son de bajo título, de poca avidéz, costosos y pueden presentar reactividad cruzada con las cadenas ligeras ligadas”.*

El Documento así pues desaconseja el uso de antisueros anti Cadenas Ligeras Libres de una manera general sólo porque “a menudo” (algunas marcas) no son de la calidad adecuada; y por ello admite implícitamente que a veces (algunas otras marcas) tales antisueros cumplen los requisitos necesarios.

Por otra parte, si fuese cierto que los antisueros anti Cadenas Ligeras Libres tuviesen reacción cruzada con las Ig enteras, no sería posible su uso en caso de co-migración de las BJP con la Ig intacta como en cambio sugiere el Documento (ver el punto sucesivo).

Es cierto que son pocos los productores de buenos antisueros anti Cadenas Ligeras Libres, como ya señala Tyllier (ref. 10 del Documento), que tienen buena reactividad específica y prácticamente ninguna reacción cruzada con las Ig enteras, y es también cierto que tales antisueros son en la actualidad más caros que los anti Cadenas Ligeras Totales, pero esto es en gran parte sólo un

problema de mercado. Si el uso de tales antisueros se extendiese, el precio bajaría y la competencia se estimularía, con el resultado que nuevos productores entrarían en el mercado.

d) Línea 45 – indicaciones para el uso de antisueros anti cadenas Ligeras Libres

*“Su uso (antisueros anti Cadenas Ligeras Libres) puede encontrar indicaciones en casos particulares, como por ejemplo la identificación de una proteína de BJ que comigra con la inmunoglobulina intacta.”*

El Documento SIBioC no aclara cuales son los criterios para identificar tales situaciones, es decir como saber a priori si la citada BJ, por cualquier motivo, comigra con la inmunoglobulina intacta.

Incluso en el caso normal de distinta movilidad de una BJ respecto a la Ig intacta, no se puede en absoluto excluir que la Ig intacta no esconda otra banda de BJ, si es que esto puede ser interesante en la práctica.

Por “lógica” si está disponible un criterio positivo fiable, este es preferible o por lo menos debe apoyar a cualquier criterio negativo en cualquier caso basado en la apariencia: sólo si no se presenta ligada la Cadena Ligera es libre.

Como conclusión yo pienso que en cualquier caso es conveniente efectuar la IFE contemporaneamente con ambos tipos de antisueros anti Cadenas Ligeras, en particular con los kits comerciales.

e) Línea 48 – sensibilidad adecuada

*“La coloración del trazado inmunofijado con colorantes coloidales (oro o Coomassie) permite el conseguir una sensibilidad adecuada (< 10 mg/L) sin tener que proceder a la concentración de la muestra (7)”.*

El Documento no aclara el material de referencia y/o el método para evaluar tal sensibilidad; ni aclara si para el oro y el coomassie se trata de métodos comerciales o “home made”.

En las evaluaciones multicéntricas de los Grupos Forlì y Liguria, siempre limitadas a las muestras examinadas, los mejores resultados se han obtenido más que con el coomassie, con el violeta.

A estas consideraciones puntuales querría añadir:

❑ Muestra

Aún estando substancialmente de acuerdo, creo que se debe tener en cuenta siempre que, a igualdad de producción, la concentración de BJP en orina está influenciada por el volumen de orina en el período de la recogida, incluso si es entre dos micciones. Esta reflexión permite en ocasiones el explicar las variaciones de resultado entre dos muestras incluso próximas en el tiempo de un mismo paciente.

❑ Determinación cuantitativa

Sobre todo en este caso me parece fundamental la diuresis u otro parámetro que la represente, como por otra parte señala el CAP; pero probablemente debería subrayarse la necesidad de expresar el dato en el informe.

Por otra parte, dado que la determinación de las Proteínas Totales y su actual dificultad y falta de fiabilidad, claramente declarada en el documento, es una variable “a monte” (en cuanto a que es necesaria para la cuantificación pero nada tiene que ver con la propia electroforesis), a mi me parece que la Electroforesis capilar nada puede innovar a este respecto.

Para finalizar, la dificultad de aislar el pico, o los picos, de BJ – pensando también en aquellos cercanos o sobrepuestos a la Transferrina que está casi siempre presente – podría impedir el obtener alguna ventaja con la capilar.

En conclusión, pienso que para la BJP no existe todavía “el método” que resuelve todos los problemas, especialmente si se considera la “eficacia y eficiencia propias”, sino que resulta necesarios un poco de capacidad, experiencia, buen sentido y ... prudencia.

Mis más cordiales saludos,

Leonardo Massaro

## Linee guida per la ricerca della Proteina di Bence Jones

Documento preparato da Maria Stella Graziani, Giampaolo Merlini, Concetta Petrini

(rilevato dal sito [www.sibioc.it](http://www.sibioc.it) il 20 febbraio 2001)

### INDICE

1. Definizione
2. Indicazioni
3. Patologie associate
4. Ricerca
5. Quantificazione
6. Bibliografia
7. Appendice A Cenni di fisiologia delle Immunoglobuline
8. Appendice B Manifestazioni cliniche causate dalla proteina di Bence Jones

## 1. La Proteina di Bence Jones (BJ)

La proteina di BJ è costituita da CATENE LEGGERE LIBERE MONOCLONALI, cioè secrete da cellule B derivate da un unico progenitore (clone) (1,2).

Nelle discrasie della linea cellulare B può essere accentuato lo sbilanciamento, già presente fisiologicamente, fra sintesi di catene pesanti e catene leggere, fino a superare la capacità di riassorbimento e metabolizzazione renale. Ne consegue la comparsa di proteina di BJ nelle urine. La proteina di BJ può essere rappresentata da catene leggere libere monoclonali intatte, da catene incomplete o frammenti, o da polimeri; da ciò deriva il rilievo di forme molecolari diverse con masse molecolari variabili.

## 2. Indicazioni (3)

Soggetti con gammopatia monoclonale sierica: al riscontro e ad ogni successivo controllo

- Sospetto clinico o laboratoristico (es ipogammaglobulinemie non attese in soggetti adulti) di malattia da catene leggere
- Sospetto clinico di amiloidosi o di malattia da deposizione di catene leggere

## 3. Patologie associate a proteina di BJ

La proteinuria di BJ può manifestarsi in diverse situazioni patologiche, le più frequenti sono

- mieloma multiplo
- macroglobulinemia di Waldenstroem
- amiloidosi
- malattia da deposizione di catene leggere.

Meno frequente è la presenza di proteinuria di BJ nei linfomi e nelle leucemie linfatiche croniche. Raramente si manifesta in associazione con neoplasie non linfoproliferative. E' stata inoltre descritta una proteinuria di BJ idiopatica (o benigna, o di incerto significato).

## 4. Ricerca

### Campione

La proteina di BJ è facilmente degradata dalla flora batterica presente in vescica, per cui è importante utilizzare urine che abbiano soggiornato in vescica il meno possibile. Il campione di elezione è dunque costituito da urine fresche, (consigliato il secondo campione del mattino, raccolto tra le ore 6 e le ore 9) (4); si può valutare l'opportunità di aggiungere sodio azide (1%) al fine di limitare la proliferazione batterica.

L'urina può essere utilizzata come tale se si dispone di un metodo di sufficiente sensibilità (vedi avanti); in caso sia clinicamente indicato ricercare la proteina di BJ con la maggiore sensibilità possibile, può essere necessario concentrare il campione.

### Metodo

Il metodo scelto deve permettere la verifica delle due caratteristiche della proteina di BJ (catene leggere libere monoclonali). Quindi dovrà essere eseguita una immunofissazione che abbinata una elettroforesi (atta a verificare l'omogeneità molecolare della proteina) ad una tipizzazione immunologica (atta a verificare che si tratta di catene leggere libere) (3, 5, 6).

Gli antisieri da utilizzare sono anti  $\kappa$  e anti  $\lambda$  totali con l'aggiunta dell'antisiero anti catena pesante della immunoglobulina presente nel siero secondo lo schema di Fig 1.

Gli antisieri anti catene leggere libere non sono consigliabili in quanto spesso sono a basso titolo, di scarsa avidità, costosi e possono presentare cross-reattività con le catene leggere legate. Il loro uso può trovare indicazione in casi particolari, quali ad esempio l'identificazione di una proteina di BJ che co-migra con l'immunoglobulina intatta.

La colorazione del tracciato immunofissato con coloranti colloidali (oro o Coomassie) consente il raggiungimento di sensibilità adeguate (< 10 mg/L) senza dover procedere alla concentrazione del campione (7).

Utilizzando metodi che abbinino elevata sensibilità con una buona risoluzione, è possibile osservare con una certa frequenza la comparsa di una serie di bande multiple (prevalentemente con antisieri anti  $\kappa$ , ma anche con antisieri anti  $\lambda$ ) che non hanno rilevanza clinica ma che possono essere confusi con proteina di BJ. In realtà sono il risultato della escrezione di catene leggere libere policlonali che

55 compaiono in individui con riassorbimento tubulare ridotto (8,9). Sono distinguibili dalla proteina di  
56 BJ perché il tracciato è tipico e ripetitivo con bande regolarmente spaziate tra di loro.

57 I metodi quantitativi immunochimici non sono consigliabili perché le seguenti ragioni (10,11):

- 58 • nel saggio quantitativo, gli antisieri non discriminano fra catene leggere monoclonali e policlonali  
59 né fra catene leggere libere e legate (a meno di utilizzare antisieri anti catene libere)
- 60 • l'antigene usato come calibratore è policlonale e perciò diverso da quello del campione che è  
61 monoclonale; viene quindi a mancare il requisito essenziale per l'accuratezza di un test  
62 immunologico e cioè il parallelismo tra antigene nel calibratore e antigene nel campione
- 63 • la proteina di BJ può essere presente in quantità molto elevata tanto da dare problemi di eccesso di  
64 antigene
- 65 • la proteina di BJ è spesso presente sotto forma di aggregati di dimensioni variabili, il che può  
66 rendere la misura immunochimica della proteina poco ripetibile.

67

68 Per la ricerca della proteina di BJ sono ugualmente da scoraggiare:

- 69 • l'utilizzo di metodi per la misura delle proteine totali (siano essi precipitanti o di dye-binding)  
70 perché poco sensibili e poco accurati
- 71 • gli sticks in uso per la rilevazione delle proteine nell'ambito dell'esame standard delle urine; tale  
72 metodo si basa sull'errore proteico degli indicatori ed è sensibile quasi esclusivamente alla  
73 albumina
- 74 • il test al calore, che va ricordato solo per il suo valore storico

75

## 76 **5. Quantificazione**

77 La quantificazione della proteina di BJ riveste una certa importanza nella diagnostica differenziale  
78 delle condizioni associate a presenza di componente monoclonale (CM) e nel monitoraggio di questi  
79 pazienti (3)

80 Questo è tuttavia un problema che non è risolvibile con le attuali tecniche di laboratorio.

81 I metodi immunochimici non sono consigliabili per le stesse ragioni esposte nella sezione  
82 "RICERCA".

83 Le linee-guida del College of American Pathologists per la gestione del soggetto con CM (6)  
84 suggeriscono la seguente procedura:

- 85 • determinazione della proteinuria delle 24 ore
- 86 • tracciato elettroforetico ed immunofissazione per la verifica della presenza di proteina di BJ
- 87 • determinazione della percentuale densitometrica del picco elettroforetico dovuto alla proteina di  
88 BJ
- 89 • espressione di tale percentuale in rapporto alle proteine totali per ricavare i g/L di proteina di BJ

90 Questa procedura è criticabile per molti aspetti:

- 91 • i metodi attualmente in uso per la misura delle proteine totali urinarie non presentano sensibilità e  
92 linearità uguale per tutte le proteine presenti nel campione, in particolare le microproteine e la  
93 proteina di BJ presentano una rilevabilità non soddisfacente. La proteinuria totale di un campione  
94 con proteina di BJ può quindi essere poco accurata
- 95 • analogamente, le diverse proteine presentano affinità diverse per i coloranti utilizzati per la  
96 colorazione dei tracciati elettroforetici e non è provato che ad intensità di colorazione uguali  
97 corrispondano uguali quantità di proteina specialmente se si utilizzano coloranti colloidali
- 98 • spesso la proteina di BJ si presenta frazionata in più bande elettroforetiche in modo che la proteina  
99 stessa è difficilmente isolabile dal tracciato e di difficile valutazione densitometrica

100 Nonostante i problemi segnalati, la procedura densitometrica proposta dal CAP è l'unica utilizzabile in  
101 caso di richiesta di quantificazione della PBJ, non essendo disponibili valide alternative. E' tuttavia  
102 consigliabile che il follow-up sia eseguito sempre nello stesso laboratorio per minimizzare la  
103 variabilità analitica.

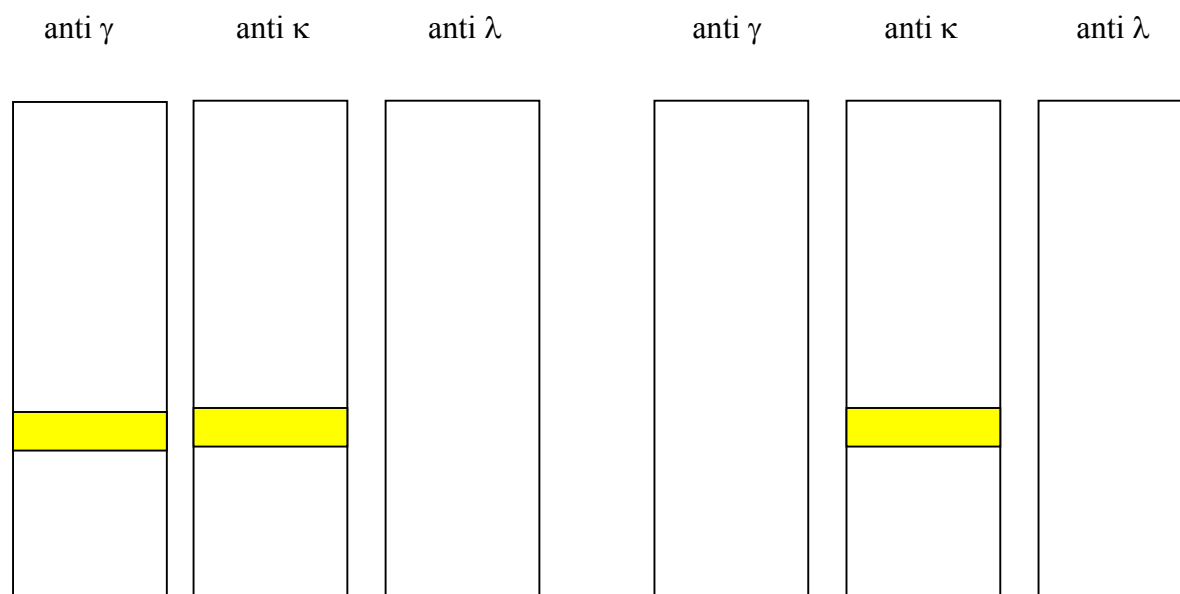
104 Resta da segnalare che gli studi attualmente in corso sull'utilizzo della elettroforesi capillare,  
105 potrebbero portare ad una soluzione del problema.

106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157

## Bibliografia

1. Berggård I, Edelman GM. Normal counter parts to Bence Jones proteins: free L polypeptide chains of human  $\gamma$  globulin.. Proc Natl Acad Sci USA 1963;49:330-7
2. Solomon A. review: light chains immunoglobulin. Structural-genetic correlates. Blood 1986;68:603-7
3. Kyle RA. Sequence of testing for monoclonal gammopathies. Serum and urine assays. Arch Pathol Lab Med 1999;123:114-8
4. Hofmann W, Guder WG. A diagnostic programme for quantitative analysis of proteinuria. J Clin Chem Clin Biochem 1989;27:589-600
5. Merlini G, Aguzzi F, Whicher J. Monoclonal gammopathies. J Internat Fed Clin Chem 1997;9:171-6
6. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, Gorevic PD, Kyle RA, Tomar RH. Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. Arch Pathol Lab Med 1999;123:106-7
7. Aguzzi F, Bergami MR, Gasparro C, , Merlini G. High sensitivity electrophoretic method for the detection of Bence Jones protein and for the study in unconcentrated urine. Ann Clin Biochem 1993;30:287-92
8. Harrison HH, The "ladder light chain" or "pseudooligoclonal" pattern in urinary immunofixation electrophoresis (IFE) studies: a distinctive IFE pattern and an explanatory hypothesis relating it to free polyclonal light chains. Clin Chem 1991;37:1559-64
9. Mac Namara EM, Aguzzi F, Petrini C, Higginson J, gasparro C, bergami MR, Bianchi G and Whicher JT. Restricted electrophoretic heterogeneity of immunoglobulin light chains in urine. A cause of confusion with Bence Jones protein. Clin Chem 1991;37:1570-4
10. Tillyer CR. The estimation of free light chains of immunoglobulins in biological fluids. Int J Clin Lab Res 1992;22:152-8
11. Boege F. Measuring Bence Jones protein with antibodies against bound immunoglobulin light chains: how reliable are the results?. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1993;31:403-5

Paziente con IgG kappa sierica



Proteina di Bence Jones: Negativa

Proteina di Bence Jones: Positiva