

Oggetto: Documento “Linee guida per la ricerca della Proteina di Bence Jones” – Internet SIBioC

Gentile Dottoressa,

mi permetto rappresentare a Lei, che sarà portavoce del Gruppo SIBioC anche a Castrocaro, alcune delle mie perplessità sui contenuti del Documento, perplessità per altro a Lei e al Gruppo già note, a parte il punto a), per quanto fu discusso nell’incontro di Rimini dello scorso anno.

Per comodità di rimando Le allego una [copia del Documento quotata nelle righe](#).

a) Rigo 57 – a proposito dei metodi immunochimici

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

Anzitutto, gli articoli citati a sostegno della tesi espressa nel Documento non mi sembra che la suffraghino, anzi, sostengono esattamente l’opposto, soprattutto ed esplicitamente Boeghe nelle conclusioni, ma anche Tyllier nell’articolo citato e anche nell’altro, suo e di altri, in J Clin Pathol del ’91.

Vorrei avere le Sue considerazioni in merito.

Nella sostanza, occorre precisare:

1. Il test immunochimico (immunoprecipitazione in fase liquida sia con il reagente anti Catene Leggere Totali sia con quello anti Libere), se è vero che ha anche caratteristiche quantitative, ha anzitutto valenza qualitativa poiché esprime comunque un “segnale di positività” (o “segnale di anormalità”, che poi, per i kit commerciali, è quasi la stessa cosa nel caso delle Catene Leggere Libere in urine) che sarà legato alla sensibilità (intesa come limite discriminante positivo da negativo), e questo è, dal punto di vista logico, perfettamente sovrapponibile a quanto accade con l’EF e/o la IFE dove il “segnale di positività” (o “segnale di anormalità”) è dato dalla banda di colore. Quindi, nel confronto dei tre metodi: EF, IFE, e Immunochimico, bisognerà sempre distinguere tra performance qualitative e quantitative di ciascun metodo, tenendo conto che, quando per qualità si intende la presenza o l’assenza di un segnale specifico, immediatamente si intende presenza o assenza di una certa quantità che quel segnale genera.

2. Rigo 58

*“nel saggio quantitativo, gli antisieri non discriminano fra catene leggere monoclonali e policlonali”*

Concordo perfettamente; i metodi immunochimici rilevano solo se vi è una certa quantità di Catene Leggere e il loro tipo (kappa, lambda, entrambe). Nella diagnostica delle BJP possono essere utilizzati solo a patto che sui positivi al test immunochimico si esegua la EF o la IFE per avere informazioni sulla mono o policlonalità.

3. Rigo 60

*“l’antigene usato come calibratore è policlonale e perciò diverso da quello del campione che è monoclonale; viene quindi a mancare il requisito essenziale per l’accuratezza di un test immunologico e cioè il parallelismo tra antigene nel calibratore e antigene nel campione”*

Concordo, ma in primo luogo questo aspetto rileva solo dal punto di vista quantitativo e non dal punto di vista positivo/negativo, in secondo luogo si tratta della stessa mancanza di parallelismo che affetta la determinazione delle Ig monoclonali nel siero e delle relative kappa e lambda e di conseguenza, del rapporto kappa/lambda, determinazioni che pure sono ampiamente diffuse nella pratica.

Comunque a me sembra che, anche per le BJP, EF ed IFE non possano essere considerate “più accurate” delle tecniche immunochimiche. Ne consegue che questo criterio non dovrebbe essere utilizzato per sconsigliare l’uso di queste a favore di quelle.

4. Rigo 63

*“la proteina di BJ può essere presente in quantità molto elevata tanto da dare problemi di eccesso di antigene”*

Vero, ma, ancora, la situazione è analoga a quella delle monoclonali Ig nel siero; e vi sono metodi e analizzatori attrezzati per non incorrere in questo problema. Per gli analizzatori non attrezzati bisognerà poi distinguere tra “eccesso assoluto”, cioè quando un campione molto alto risulta falsamente negativo e “eccesso relativo”, cioè quando un campione molto alto risulta più basso di quanto dovrebbe. Quest’ultima situazione ha solo valenza quantitativa, mentre la prima è evitabile, per quanto è dato sapere, con opportuni accorgimenti.

5. Rigo 65

*“la proteina di BJ è spesso presente sotto forma di aggregati di dimensioni variabili, il che può rendere la misura immunochimica della proteina poco ripetibile.”*

Vero, ma anche questo fenomeno rileva solo dal punto di vista quantitativo e non dal punto di vista positivo/negativo.

D’altra parte l’EF (e quindi anche la IFE) subiscono interferenze per la stessa causa: una banda o due o tre, aggravata dal fatto che la sensibilità delle tecniche elettroforetiche nell’evidenziare una certa quantità di proteina diminuisce man mano che aumenta la superficie (o meglio il volume) su cui è distribuita quella quantità. In altre parole, se all’EF (e alla IFE) vediamo una banda, non è detto che riusciamo a vedere quella quantità di proteina quando essa fosse distribuita in due o tre bande.

b) Rigo 38 – a proposito del metodo da eseguire

*“Quindi dovrà essere eseguita una immunofissazione ...”*

Il documento del Gruppo SIBioC suggerisce la IFE quale unico metodo per la ricerca qualitativa della BJP.

1. Il documento non chiarisce se la IFE che viene suggerita è tra quelle commercialmente disponibili o è “home made”.
2. I Gruppi Forlì e Liguria hanno rilevato che la IFE eseguita con i kit commerciali in uso nei Laboratori partecipanti, almeno sui campioni esaminati, ma ciò è già sufficiente, ha dimostrato sensibilità inferiore a quella dei metodi immunonefelometrici e immunoturbidimetrici, ma soprattutto riproducibilità interlaboratorio insoddisfacente anche a parità di metodo.

c) Rigo 44 – a proposito degli antisieri anti Catena Leggera

*“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 Documento quindi sconsiglia l’uso di antisieri anti Catena Leggera Libera in generale solo perché “spesso” (alcune marche) non sono di qualità adeguata; e perciò ammette implicitamente che a volte (alcune altre marche) tali antisieri hanno i requisiti richiesti.

Per altro, se fosse vero che gli antisieri anti Catene Leggere Libere cross reagiscono con le Ig intere, non sarebbe dirimente il loro uso in caso di co-migrazione della BJP con la Ig intatta come invece suggerito nel Documento (vedi punto seguente).

E’ vero che sono pochi i produttori di buoni antisieri anti Catena Leggera Libera, come pure nota Tyllier (rif. 10 del Documento), che abbiano buona reattività specifica e praticamente nessuna cross reazione con le Ig intere, ed è pure vero che tali antisieri sono attualmente più cari di quelli anti Catene Leggere Totali, ma è in gran parte solo un problema di mercato. Se l’uso di

tali antisieri si diffondesse, il prezzo crollerebbe e la concorrenza sarebbe stimolata, col risultato che nuovi produttori si affaccerebbero sul mercato.

d) Rigo 45 – indicazioni all'uso di antisieri anti Catene Leggere Libere

*“Il loro uso (antisieri anti Catena Leggera Libera) può trovare indicazione in casi particolari, quali ad esempio l'identificazione di una proteina di BJ che co-migra con l'immunoglobulina intatta.”*

Il Documento SIBioC non chiarisce quali sono i criteri per rilevare l'attuarsi della condizione, cioè come fare a sapere a priori se la specifica BJ ha, per qualsiasi motivo, co-migrato con l'immunoglobulina intatta.

Anche nel caso normale di diversa mobilità di una BJ rispetto alla Ig intatta, non si può in assoluto escludere che la Ig intatta non nasconda un'altra banda di BJ, per quanto ciò possa essere interessante nella pratica.

Per “logica” se è disponibile un criterio positivo affidabile, questo è da preferire o almeno da affiancare ad un qualsiasi criterio negativo oltretutto basato sull'apparenza: solo se non appare legata la Catena Leggera è libera.

In conclusione io penso che in ogni caso è opportuno eseguire la IFE contemporaneamente con entrambi i tipi di antisiero anti Catena Leggera, in particolare con i kit commerciali.

e) Rigo 48 – sensibilità adeguata

*“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)”.*

Il Documento non chiarisce il materiale di riferimento e/o il metodo per valutare tale sensibilità; né chiarisce se per l'oro e il coomassie si tratta di metodi commerciali o “home made”.

Nelle valutazioni multicentriche dei Gruppi Forlì e Liguria, sempre limitatamente ai campioni esaminati, i migliori risultati sono stati ottenuti oltre che col coomassie, anche con il violetto.

A queste considerazioni puntuali vorrei aggiungere:

□ Campione

Pur concordando nella sostanza, ritengo che si debba tenere sempre conto che, a parità di produzione, la concentrazione di BJP in urine è influenzata dal volume d'urina nel periodo della raccolta, anche se è quello tra due minzioni. Questa riflessione consente a volte di spiegare la variazione di risultato tra due campioni anche ravvicinati dello stesso paziente.

□ Determinazione quantitativa

Anzitutto in questo caso mi sembra fondamentale la diuresi o altro parametro che la rappresenti, come del resto dice il CAP; ma forse sarebbe da sottolineare la necessità di esprimere il dato nel referto.

Poi, dato che la determinazione delle Proteine Totali e la sua attuale difficoltà e inaffidabilità, chiaramente dichiarata nel documento, è una variabile “a monte”, a me sembra che l'Elettroforesi capillare nulla possa innovare al riguardo.

Infine, la difficoltà di isolare il picco, o i picchi, di BJ – si pensi anche a quelli vicini o sovrapposti alla transferrina che è quasi sempre presente – potrebbe non trarre alcun vantaggio dalla capillare.

In conclusione, penso che per le BJP non vi è ancora “il metodo” che risolve ogni problema, specie se si considera “efficacia e efficienza propria”, ma occorre un po' di competenza, esperienza e buon senso, e ... prudenza.

I più cordiali saluti,

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 a 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.

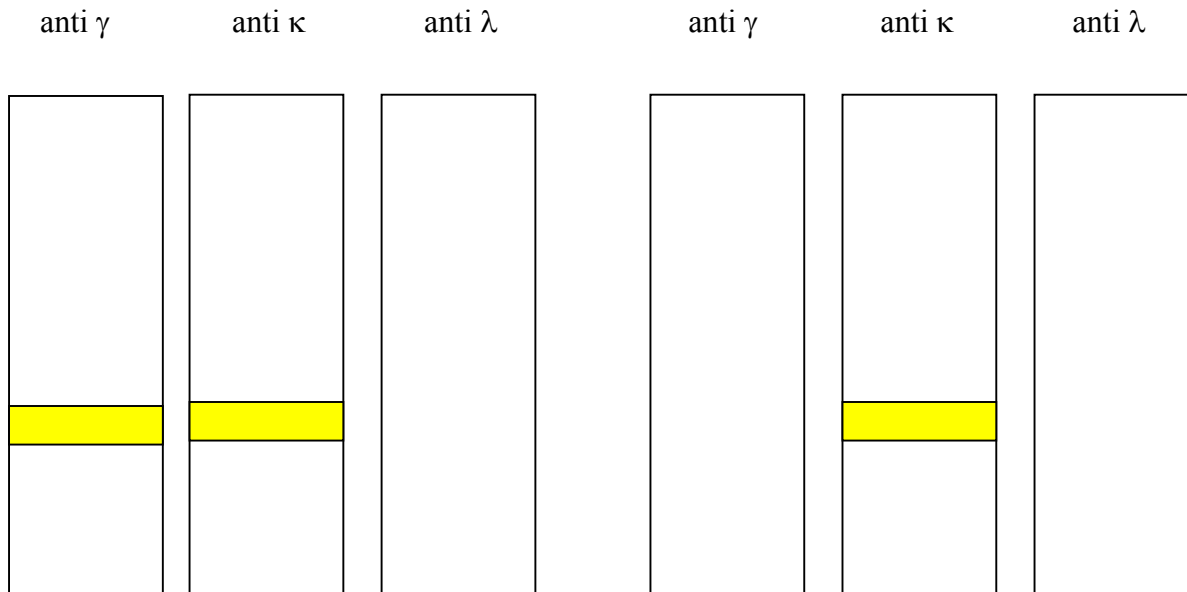
104 Resta da segnalare che gli studi attualmente in corso sull'utilizzo della elettroforesi capillare,  
105 potrebbero portare ad una soluzione del problema.

## Bibliografia

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

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