

Determinación inmunonefelométrica de cadenas ligeras libres de inmunoglobulinas en orina

Jiménez, M.; Preciado, E.; Mateo, G.; Rodríguez, M. M.; García-Valdecasas, I. Hospital Txagorritxu. Laboratorio de Bioquímica. Vitoria.

Palabras clave: Inmunonefelometría, antisueros específicos anti-kappa y anti-lambda libre, orinas no concentradas.

Keywords: Immunonefelometry, antisera specific for free kappa and lambda chains, not concentrated urines.

Measurement of free light chains immunoglobulin in urine by a nephelometric immunoassay

RESUMEN

El método se basa en la reacción de inmunoprecipitación en fase líquida, con antisueros específicos absorbidos anti-kappa y anti-lambda libre, de NSC (New Scientific Company). Los inmunocomplejos se cuantificaron con un nefelómetro BNA (Behring Diagnostic), realizándose con dichos antisueros estudios de precisión, linealidad y comparación con otro método. Se obtuvieron CV intraseriales menores del 5%, excepto para kappa libre a concentración alta (12,7%). Los CV interseriales fueron mayores del 5%, exceptuando lambda libre a concentración baja (2,8%).

Los análisis resultaron lineales hasta una concentración de 300 mg/dl de Kappa libre, y de 150 mg/dL de lambda libre. Se compararon los resultados de kappa y lambda libre (NSC) con los de kappa y lambda total (antisueros de Behring Diagnostic), observándose que los valores obtenidos con orinas normales eran menores que los cut off asignados ($\leq 4,5$ K total, $\leq 2,6$ L total, ≤ 1 K libre, $\leq 0,7$ L libre). Las orinas con cadenas ligeras libres policlonales presentaron uno o más resultados mayores que los cut off, y las orinas con proteínas Bence Jones mostraron todos los valores más altos que los cut off.

SUMMARY

The procedure is based on immunoprecipitin reactions in a fluid phase of free light chains with adsorbed antisera, specific for free kappa and lambda chains, of New Scientific Company (NSC). The resulting immunocomplexes were quantified with a BNA nephelometer (Behring Diagnostic), we have performed studies of reproducibility, linearity and method comparison.

Within-run coefficients of variation (CV) were $< 5\%$, except for free kappa chains at high concentration (CV = 12,7%); between-run CV was 2,8% for free lambda chains at low concentration and $> 5\%$ for the rest the samples.

The assays were linear up to concentrations of 300 mg/dl and 150 mg/dl and 150 mg/dl for free Kappa and Lambda chains, respectively.

The results for total kappa and lambda chains (Behring) were compared with those for free kappa and lambda chains (NSC). We have found that normal urines gave concentrations below the cut off values with both antisera ($< 4,5$ mg/dl for total kappa, $< 2,6$ mg/dl for total lambda, < 1 mg/dl for free kappa, $< 0,7$ mg/dl for free lambda); urines with polyclonal light chains showed one or more pathological results, and above the cut off values in all the cases for urines with Bence-Jones proteins (kappa or lambda).

INTRODUCCIÓN

La proteína de Bence Jones fue el primer marcador tumoral específico descubierto (1). Su identidad química con las cadenas ligeras libres de inmunoglobulinas fue establecida en 1962 por Edelman y Gally (2).

La síntesis de inmunoglobulinas de cadenas ligeras está unida a la síntesis de cadenas pesadas, en las células linfocíticas B maduras, y en condiciones normales se produce un pequeño exceso de cadenas ligeras libres (3). Se filtran rápidamente por el riñón con un aclaramiento glomerular de 6-10 ml/min (4), y el 95% son catabolizadas o reabsorbidas por el túbulo proximal, resultando que las concentraciones en suero y orina normales son solamente el 0,1% de las inmunoglobulinas totales. En aquellas enfermedades en las cuales la producción de proteínas de cadenas ligeras se encuentra aumentada, se excede la capacidad del túbulo proximal para reabsorber todas las proteínas filtradas, encontrándose dichas proteínas aumentadas en la orina. Su presencia denota enfermedad sistémica; así la proteinuria de cadenas ligeras es un marcador importante para la gammapatía monoclonal y una variedad de enfermedades linfoproliferativas (5); es detectable en el 47-70% de pacientes con mieloma múltiple (6), en el 30-40% de pacientes con macroglobulinemia de Waldenström (7), en el 92% de pacientes con amiloidosis (8); también en linfoma (9), leucemia linfocítica crónica (10), y raramente en adenocarcinoma de páncreas (11), carcinoma medular de tiroides (12) y linfadenopatía angioinmunoblástica (13).

Existen numerosos métodos para la determinación de cadenas ligeras libres de inmunoglobulinas, que se pueden incluir en dos grupos:

- Electroforéticos, que se utilizan como método de screening y dan información cualitativa o semicuantitativa, siendo la Inmunofijación el más sensible. Estos métodos presentan los inconvenientes de imprecisión, problemas de

tinción y resolución de las bandas debido a la heterogeneidad de las inmunoglobulinas (14, 15).

- Inmunológicos, que dan información cuantitativa y aprovechan la individualidad antigénica de las inmunoglobulinas para obtener antisueros específicos frente a cadenas ligeras totales o frente a cadenas ligeras libres. Estos métodos suelen ser más fiables y precisos, pero algunos presentan el inconveniente de exceso de antígeno y también es importante la calidad del antisuero, ya sea monoclonal o policlonal (16, 17, 18, 19).

En este grupo se encuentra la inmunoprecipitación en fase líquida, por turbidimetría o por nefelometría, siendo este último el estudio en nuestro trabajo, basado en la adaptación y valoración de los reactivos aportados por la casa comercial NSC, con un nefelómetro BNA (Behring).

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Orinas de la rutina de nuestro laboratorio, cuyas peticiones iban enfocadas a la búsqueda de cadenas ligeras libres o proteínas de Bence Jones. Una vez clasificadas por métodos electroforéticos, se almacenaron sin conservantes a -20°C hasta el momento de la determinación nefelométrica. Las muestras, después de centrifugación (2.500 rpm, 10 minutos) se analizaron sin necesidad de concentración previa.

Aparato

Behring Nephelometer Analyzer-BNA (Behring Diagnostic, Barcelona, España).

Reactivos

Equipo de Nefelometría BNA-Orina de NSC (New Scientific Company):

- Antiseros (FRK-BNA/FRL-BNA), anticadenas ligeras libres Kappa y Lambda, listos para su uso.
- Calibradores-Controles (UPC-FRK/UPC-FRL), liofilizados de muestras de orinas de pacientes con mieloma. Se reconstruyeron según instrucciones del fabricante. Concentraciones de los calibradores: cadenas ligeras libres Kappa, 20 mg/dl; cadenas ligeras libres Lambda 14 mg/dl.
- Control Positivo: calibrador diluido 1/16 con solución salina fisiológica.
- Control Negativo: PBS o solución salina fisiológica (Blanco de reactivo).

Reactivos de Behring Diagnostic:

- Antiseros anticadena ligera total kappa y lambda.
- Calibradores, controles, diluyente de muestra y tampón de reacción.

Procedimiento

El método se basa en la reacción de inmunoprecipitación en fase líquida, con antiseros específicos absorbidos, anticadenas ligeras libres kappa y lambda. El análisis nefelométrico es del tipo Fixed-Time, que consiste en la diferencia entre dos medidas secuenciales de luz dispersada.

En la Tabla I se muestran los principales parámetros de programación en el BNA para la determinación de cadenas ligeras libres kappa y lambda en orina.

RESULTADOS

Imprecisión

La repetibilidad intraserial se estudió analizando series de 21 alícuotas de tres niveles de concentración de kappa y lambda en orinas (Bence Jones positivas), obteniéndose coeficientes de variación (CV) <5%, excepto para kappa libre a concentración alta, que presentó un CV de 12,6% (Tabla II).

TABLA I
Parámetros para la determinación de kappa y lambda libre en el nefelómetro BNA

	Kappa libre		Lambda libre
Volumen muestra (µl)	20		20
		Dilución muestra 1:1.0	
		Dilución mínima 1:1.0	
Reactivo 1 (µl)	80		80
Reactivo 2 (µl)	0		0
N Tampón reacción 1	80		80
N Tampón reacción 2	80		80
Tiempo de medida (min)	18	Fixed-Time	18
N.º Puntos estándar	5		5
1.ª Dilución	1:1.0		1:1.0
Desviación permitida (%)	15.0		15.0
Rango medida (mg/dl)			
Límite inferior	1		0.7
Límite superior	20		14

La imprecisión interserial se calculó a partir de 10 determinaciones en días consecutivos, también para tres niveles de concentración de cadenas lige-

ras libres en orina, obteniéndose unos CV >5% en todos los niveles, menos para lambda libre a concentración baja, con un CV de 2,8% (Tabla III).

TABLA II
Imprecisión en la determinación de kappa libre en orina

		Nivel I	Nivel II	Nivel III
Intraserial	n = 21			
	\bar{x} (mg/dl)	12.4	28.6	64.6
	D.S	0.26	1.14	8.1
	CV (%)	2.1	3.9	12.6
Interserial	n = 10			
	\bar{x} (mg/dl)	14.4	26.5	72.3
	D.S	0.9	2.1	6.1
	CV (%)	6.4	8	8.4

TABLA III
Imprecisión en la determinación de lambda libre en orina

		Nivel I	Nivel II	Nivel III
Intraserial	n = 21			
	\bar{x} (mg/dl)	11.1	25.5	66
	D.S	0.17	1.04	1.96
	CV (%)	1.6	4	3
Interserial	n = 10			
	\bar{x} (mg/dl)	7.2	20.4	56.4
	D.S	0.2	1.5	7.3
	CV (%)	2.8	7.6	12.8

Comparación de métodos

La comparación se realizó con 70 muestras, que comprendían orinas normales, orinas con cadenas ligeras libres policlonales y orinas con proteínas Bence Jones (identificadas por IFE). Se trata de un estudio cualitativo en el cual se relacionan, mediante los *cut off*, los valores de kappa y lambda total (reactivo de Behring) con los valores de kappa y lambda libre (reactivo de NSC), cuantificados nefelométricamente.

Los resultados obtenidos con orinas normales eran menores al *cut off* asignado ($\leq 4,5$ mg/dl de K total, $\leq 2,6$ mg/dl de L total, ≤ 1 mg/dl de K libre, $\leq 0,7$ mg/dl de L libre). Las orinas con cadenas ligeras libres policlonales presentaron uno o más resultados cuantitativos patológicos, y las orinas con proteínas Bence Jones, mostraron concentraciones superiores a los valores *cut off*, tanto para cadenas ligeras totales como para libres (Tabla IV).

TABLA IV
Comparación de las cadenas ligeras según *cut-off*

	K total	K libre	λ total	λ libre
Orinas				
Normal (n = 22)	$\leq 4,5$ (n = 22)	≤ 1 (n = 22)	$\leq 2,6$ (n = 22)	$\leq 0,7$ (n = 22)
Policlonal (n = 4)	$\geq 4,5$ (n = 4)	≥ 1 (n = 3)	$\geq 2,6$ (n = 3)	$\geq 0,7$ (n = 2)
Monoclonal K (n = 23)	$> 4,5$ (n = 23)	> 1 (n = 23)	$\leq 2,6$ (n = 23)	$\leq 0,7$ (n = 23)
Monoclonal λ (n = 21)	$\leq 4,5$ (n = 21)	≤ 1 (n = 21)	$> 2,6$ (n = 21)	$> 0,7$ (n = 21)

n:n.º de muestras.

Linealidad

Para el estudio de linealidad se realizaron diluciones seriadas de una orina de alta concentración de proteína Bence Jones, tanto kappa como lambda, con un *pool* de orina de baja concentración de ambas. Para kappa libre, se encontró que el análisis era lineal hasta una concentración de 300 mg/dl, en un intervalo estudiado de 15,5 a 418 mg/dl (Fig. 1). Para lambda libre, la linealidad se extendía hasta 150 mg/dl en un intervalo estudiado de 9,15 mg/dl a 177 mg/dl (Fig. 2).

DISCUSIÓN

La detección y medición de cadenas ligeras libres de inmunoglobulinas en líquidos biológicos, y particularmente en la orina, no han sido todavía completamente resueltas en medicina clínica, debido a diferencias en sensibilidad y a la falta de estandarización, tanto en análisis cuantitativos como cualitativos (3, 20).

La capacidad para identificar de forma fiable en orina cadenas ligeras libres monoclonales o proteína

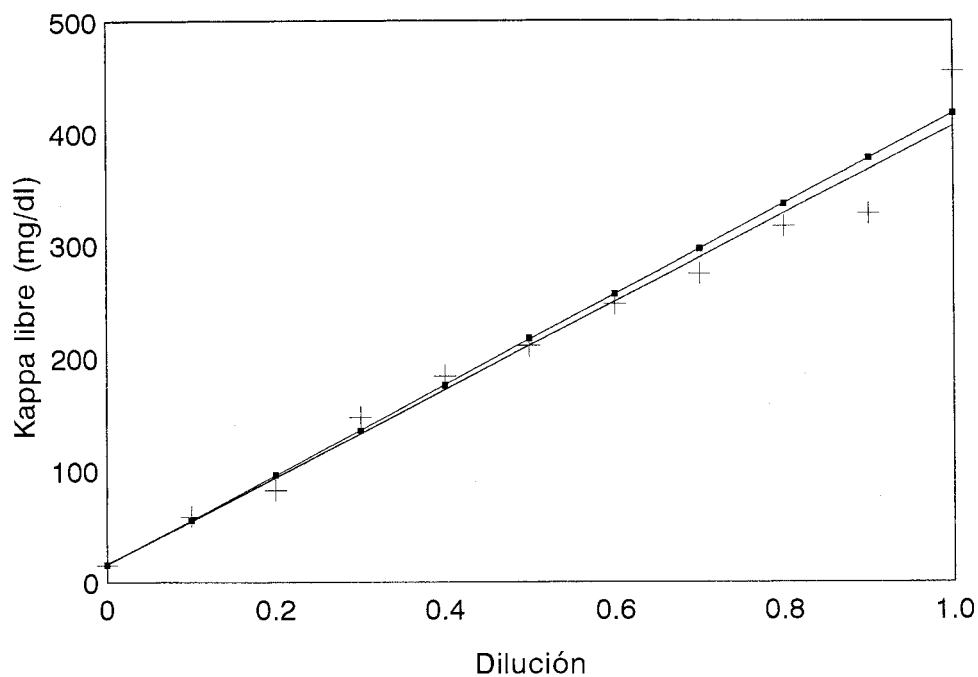


Figura 1. Linealidad de Kappa libre en orina.

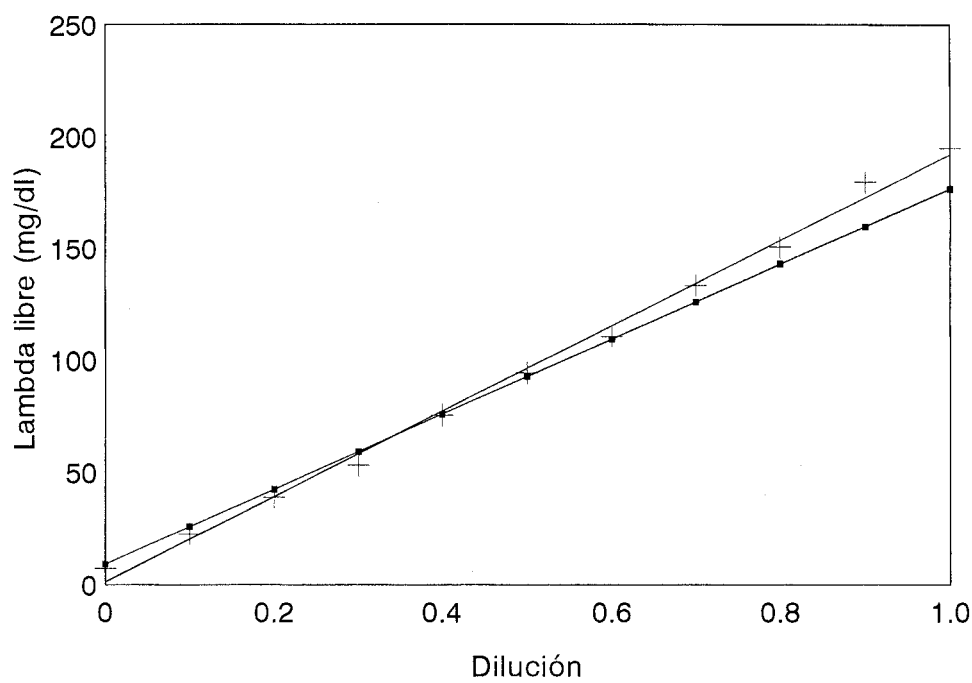


Figura 2. Linealidad de Lambda libre en orina.

Bence Jones es de gran interés clínico, ya que constituye un marcador importante para la gammopatía monoclonal y una variedad de enfermedades linfoproliferativas (5, 6, 7, 8, 9), también cuando la presentan en cantidades pequeñas, que frecuentemente no son detectadas por los métodos de rutina que se emplean en la mayoría de los laboratorios (1, 14, 15).

El método de inmunoprecipitación en fase líquida con el nefelómetro BNA (Behring), utilizando los antiseros de NSC, es una técnica simple y rápida que no requiere tiempos de incubación muy prolongados, obteniendo los resultados a los 18 minutos con una precisión aceptable, teniendo en cuenta que el nefelómetro acepta un porcentaje de desviación alto respecto a los valores de control (15%), con un margen de linealidad superior al del fabricante (200 mg/dl para kappa libre y 140 mg/dl para lambda libre), aunque no es posible detectar que una muestra presente exceso de antígeno.

El método permite usar muestras de orina no concentradas y sin pretratamiento, con buena especificidad, ya que reacciona sólo con los determinantes antigénicos de las cadenas ligeras libres.

El procedimiento sirve sobre todo para *screening* cualitativo, ya que la monoclonalidad deberá ser confirmada con métodos electroforéticos, y sus resultados cuantitativos son útiles para la monitorización de la respuesta tumoral en el tratamiento de mielomas Bence Jones, también orientan sobre cuánto debe concentrarse las muestras para estudios posteriores.

Correspondencia:

Montaña Jiménez Álvaro
Plaza Juan de Loaisa, 10, 2.º B
10600 Plasencia, Cáceres

BIBLIOGRAFÍA

1. Hobbs JR. Bence Jones proteins. In: Marcks V, Hales CN (eds). *Essays in Medical Biochemistry*. The Biochemical Society and The Association of Clinical Biochemists. London 1975; 1:105-131.
2. Berggard I, Edelman GM. Normal counterparts to Bence Jones proteins free L polypeptide chains of human γ -globulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963; 49:330.
3. Tillyer CR. Clinical applications of immunoglobulin free light chain estimations. *Int J Clin Lab Res* 1993; 23:25-29.
4. Megensen CE, Solling K. Studies on renal tubular protein reabsorption. Partial and near complete inhibition by certain aminoacids. *Scand J Clin Lab Invest* 1977; 37:477.
5. Perry MC, Kyle RA. The clinical significance of Bence Jones proteinuria. *Mayo Clin Proc* 1975; 50:234-238.
6. Dammaco F, Waldeström J. Serum and urine light-chain levels in benign monoclonal and Waldeström's macroglobulinemia. *Clin Exp Immunol* 1968; 3:911-921.
7. Isobe T, Osserman EF. Patterns of amyloidosis and their association with plasma cell dyscrasia, monoclonal immunoglobulins and Bence Jones proteins. *N Engl J Med* 1974; 290:473-477.
8. Azar HA, Hill WT, Osserman EF. Malignant lymphoma and lymphatic leukemia associated with myeloma type serum. *Am J Med* 1957; 23:239-249.
9. Seligmann M, Clauvel J. Current views on immunoglobulin abnormalities and B cell proliferations, in *Advances in Nephrology*, edited by Hamburger J, Crosnier J, Grünfeld JP, Maxwell MH. Chicago, Year Book Medical Publisher 1978; 237-289.
10. Hobbs JR, Evans DJ, Wrong OM. Renal tubular obstruction by mucoprotein from adenocarcinoma of pancreas. *Br Med J* 1974; 2:87-89.
11. Ibanez ML, Russell WO, Abores-Saavedra J, Lamperfico P, White EC, Clerk RL. Thyroid carcinoma: biologic behavior and mortality. *Cancer* 1966; 19:1039-1052.
12. Baht JG, Kerpen HO, Murphy PS, Horowitz LJ, Valdenrama JH. Angioimmunoblastic lymphadenopathy. Bence Jones proteinuria and acute renal failure. *Arch Intern Med* 1981; 141:1373-1374.
13. Keren DF, Di Sante AC, Bordine SL. Densitometric scanning of high-resolution electrophoresis of serum: methodology and clinical application. *Am J Clin Pathol* 1986; 85:348.

14. Kohn J. Cellulose acetate electrophoresis and immunoelectrophoresis. In: Smith I (ed). Chromatographic and electrophoretic techniques. Vol 2, Heinemann London 1976; 90-137.
15. Axiak SM, Krishnamoorthy L, Guinan J, Raison, RL. Quantitation of free light chains in serum and urine using a monoclonal antibody based inhibition enzyme-linked immunoassay. *J Immunol Methods* 1987; 99:141.
16. Brouwer J, Otting-Van der Ruit MO, Busking-Van der Lely HB. Estimation of free light chains of immunoglobulins by enzyme immunoassays. *Clin Chem Acta* 1985; 150:267.
17. Cole PW, Durie BGM, Salmon SE. Immunoquantitation of free light chain immunoglobulins application in multiple myeloma. *J Immunol Methods* 1978; 19:341.
18. Tillyer CR, Iqbal J, Raymond J, Gore M, McIlwain TJ. Immunoturbidimetric assay for estimating free light chains of immunoglobulins in urine and serum. *J Clin Pathol* 1991; 44:466-471.
19. Robinson EL, Gowland E, Ward ID, Scarffe JH. Radioimmunoassay of free light chains of immunoglobulins in urine. *Clin Chem* 1982; 28:2254.
20. Tillyer CR. The estimation of free light chains of immunoglobulins in biological fluids. *Int J Clin Lab Res* 1992; 22:152-158.
21. Leslie ST Fang. Light-chain nephropathy. *Kidney International* 1985; 27:582-592.