

## Un contributo sulla ricerca delle Proteine di Bence Jones – Revisione dall'archivio degli Ospedali Galliera di Genova

Liliana Burlando

Già Laboratorio Analisi, Ospedale Galliera - Genova

### *Indice*

- ❑ Introduzione
- ❑ Scopo dello studio
- ❑ Informazioni esaminate e metodi
- ❑ Risultati
- ❑ Discussione
- ❑ Bibliografia
- ❑ Tabelle e Figure

<i>Abbreviazioni</i>	
BJP	(Bence Jones Proteins) Proteine di Bence Jones
EF	(Electrophoresis) Elettroforesi
IFE	(Immunofixation) Immunofissazione
LC(b&f)	(Total Light Chains (bound & free)) Catene Leggere Totali (libere & legate)
FLC	(Free Light Chains) Catene Leggere Libere
MC (CM)	(Monoclonal Component / Gammopathy) Componente / Gammapatia Monoclonale

## Introduzione

La recente pubblicazione delle “Linee guida per la ricerca della Proteina di Bence Jones” (1) da parte del Gruppo di Studio Proteine della SIBioC mi ha indotto ad un esame della nostra casistica di gammopatie monoclonali mirato in particolare ai casi di urine con BJP co-migrante con la Ig-monoclonale intatta.

Devo ringraziare il Professor Romano, Direttore del Laboratorio Analisi del Galliera, per la collaborazione prestata e la Dott.ssa Campanella e il Dott. Pittaluga per l'aiuto fattivo.

Si tratta di un archivio computerizzato che, iniziato nel 1992, termina a metà del '99 (anno in cui fu cambiato programma e sistema di archiviazione) e contiene 10.146 registrazioni di analisi protidologica serica di pazienti con gammopatia monoclonale (MC) delle quali 2.355 complete anche dei dati relativi alla ricerca delle Proteine di Bence Jones (BJP) nelle urine.

## Scopo dello studio

Il contenuto dell'archivio è stato analizzato non tanto per meri fini statistici ma piuttosto focalizzando l'attenzione al riscontro di positività per le BJP in rapporto agli antisieri utilizzati nella ImmunoFissazione (IFE) per evidenziarle.

## Informazioni esaminate e metodi

La revisione riguarda le registrazioni dell'analisi protidologica di urine risultate positive per la presenza di MC nel periodo dal '92 a tutto il '97; tale delimitazione si è resa necessaria per avere uniformità nei criteri di ricerca della BJP e nell'archiviazione dei dati.

Infatti in quel periodo le urine – era richiesto, di norma, un campione fresco della seconda minzione del mattino – dei pazienti con MC serica e/o con richiesta di ricerca di BJP per sospetto clinico erano così processate:

- elettroforesi (EF) su acetato (Gelman-Dasit) colorazione oro colloidale (Dasit)
- immunofissazione (IFE) su urina come tale e concentrata 100 volte (sistema Minicon da banco) con antisieri anti Catene Leggere Totali (bound&free) (LC(b&f) kappa e lambda ed anche anti Catene Leggere Libere (FLC) kappa e lambda, oltre all'antisiero anti catena pesante della/e Ig monoclonale/i presente/i nel siero.

Le IFE erano eseguite con i sistemi standard IFE Paragon di Beckman oppure Hydragel manuale di Sebia con relativo corredo di antisieri; mentre gli antisieri anti FLC erano alternativamente o Dako o NSC.

Si faceva sempre una prima lettura dopo colorazione con blu-Coomassie ed una successiva dopo sovra-colorazione con violetto.

## Risultati

I risultati sono riportati in [Tabella: 1](#) e [2](#) nelle [Figure da 1 a 4](#). È opportuno precisare che:

- a. nei diversi gruppi i pazienti sono conteggiati una sola volta se il dato analitico è identico nelle diverse ricorrenze, se invece il dato analitico è diverso, lo stesso paziente è stato inserito in più di un gruppo.
- b. i gruppi di Tabella 1 e 2 e le relative Figure sono “schematici e riassuntivi”; pur omogenei dal punto di vista logico-interpretativo per la composizione della/e MC, comprendono immagini EF e IFE diversificate.

In totale si tratta di 1043 casi suddivisi come segue:

- 635 pazienti con urina compiutamente negativa sia per la BJP sia per la Ig monoclonale intatta.
- 101 pazienti con urina positiva per la sola Ig-monoclonale intatta ma BJP negativi ([Tabella 1](#) - Colonna D, [Figura 4](#)); di questi, 95 presentavano una sola MC e 6 due MC, tutte naturalmente costituite da Ig intatte.
- 307 pazienti con urina positiva per BJP ([Tabella 1](#) - Colonne A+B+C) che si distinguono come segue:
  - 202 pazienti con positività per la sola BJP ([Tabella 1](#) - Colonna A; [Figura 1](#)); nella realtà la BJP si presenta con una, due o più bande e raramente si accompagna a ladder.
  - 85 pazienti con positività per la BJP e per la Ig-monoclonale intatta con distinte bande ([Tabella 1](#) - Colonna B; [Figura 2](#)); anche qui la BJP può presentarsi in diverse bande e la Ig intatta può presentarsi di due diverse classi (per esempio IgG-kappa+IgM-kappa), o anche combinazioni delle situazioni suddette.
  - 20 pazienti con positività per BJP e per Ig-monoclonale intatta con co-migrante (unica banda). In questi ultimi casi le Ig-monoclonali intatte erano 12 di tipo kappa (6 IgG e 6 IgM) e 8 lambda (7 IgG e 1 IgM) ([Tabella 1](#) - Colonna C; [Figura 3, 3/A, 3/B](#)).

Questo gruppo è in realtà composto da:

- 15 campioni che presentano una sola banda costituita da Ig monoclonale intatta perfettamente sovrapposta alla BJP ([Fig. 3](#))
- 3 campioni che presentano una banda di Ig intatta sovrapposta alla BJP e un'altra banda di sola Ig intatta che è, in un caso, omologa alla prima e in due casi diversa ([Figura 3/A](#))
- 2 campioni che presentano una banda costituita da Ig intatta co-migrante con la BJP e un'altra banda costituita dalla sola BJP ([Figura 3/B](#)).

## Discussione

Osserviamo così che il fenomeno della co-migrazione si è verificato nel 6,5% dei pazienti con urina positiva per BJP e nel 4,9% dei pazienti con MC nell'urina.

Molto più interessante è tuttavia analizzare questi dati alla luce di quanto emerge dalle linee guida SIBioC (1) ed in particolare dove viene detto:

*“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”.* (Figura 6)

Nella nostra casistica 121 casi sono riconducibili all'esempio riportato nella figura 6 a sinistra (Tabella 1 – Colonna C+D), ovvero MC reagenti positivamente con l'antisiero anti LC(b&f) e con quello anti catena pesante della Ig serica.

Ma in 20 di essi si osserva reazione anche con l'antisiero anti FLC: verificammo così un 16,5% di casi di co-migrazione BJP e Ig intatta che avrebbero potuto sfuggire senza l'uso dell'antisiero anti FLC (Tabella 1 – Colonna C; Figura 3).

La percentuale non mi sembra trascurabile.

Le linee guida a tal proposito affermano:

*“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”.*

Per quanto riguarda le prime due affermazioni mi sembra non escludano la possibilità di reperire antisieri anti FLC di avidità e titolo soddisfacenti e allora sarebbe stato forse più opportuno suggerire l'uso di antisieri di tal fatta e/o di criteri per valutare tali requisiti.

Sul costo non voglio entrare nel merito.

Osservo ancora che nulla viene detto sul criterio per distinguere i casi di BJP co-migrante, nei quali pure è raccomandato l'uso degli antisieri anti FLC.

Mi voglio invece soffermare sulla questione della possibile Cross-Reattività: infatti, consultando con attenzione l'archivio ho trovato 10 pazienti tra i 20 della co-migrazione nei quali è possibile ragionevolmente escludere questa eventualità.

Per questi motivi:

- in 6 pazienti si è registrato un campione positivo per BJP co-migrante con la Ig intatta e, in tempi diversi, un campione che presenta nella stessa posizione la sola Ig intatta, senza alcuna reazione con l'antisiero anti FLC (Figura: 5).
- in 2 pazienti si osservava la reazione positiva con l'antisiero anti FLC solo nel campione d'urina concentrata, mentre quella non concentrata evidenziava la sola Ig intatta; ma per gli stessi pazienti in data diversa si evidenziava anche sul

campione come tale, non concentrato, la BJP con l'antisiero anti FLC e nella identica posizione.

Peraltro, nel gruppo A era frequente osservare netta positività su urina come tale con antisiero anti LC e, nella stessa posizione una positività meno evidente o negatività con l'antisieri anti FLC: la ricolorazione della striscia o la concentrazione del campione rendevano talora evidente la reazione anche con gli antisieri anti FLC. Campioni di urina come tale in date diverse mostravano buona positività con entrambi i tipi di antisiero (presumibilmente contenevano maggiore quantità di BJP).

- in 3 pazienti si osservavano nelle urine 2 MC, entrambe costituite da Ig intatta, ma su di una sola di esse si evidenziava la BJP co-migrante (Figura 3/A).

Del resto se consideriamo i 105 pazienti della nostra casistica nelle urine dei quali si riscontrava la BJP e insieme la Ig-monoclonale intatta (Tab.1 – Col. B+C), in 85 di essi (81%) le due bande erano distinte e gli antisieri anti FLC reagivano positivamente con una sola delle due e cioè con quella che non reagiva con l'antisiero anti catena pesante della Ig serica, e neppure si poteva osservare una qualche forma di reazione aspecifica verso l'altra MC (quella cioè costituita da Ig intatta) (Figura 2).

Come pure nessun sospetto di reazione aspecifica si osservava usando gli antisieri anti FLC nei confronti della MC dei 101 pazienti con urina positiva per la sola Ig intatta (Tab.1 - Col. D; Figura 4).

Riguardo alla sensibilità degli antisieri anti FLC (avidità, titolo) in confronto a quelli anti LC(b&f) nulla può più dire l'archivio, dove venivano registrate le MC, la loro costituzione, la loro mobilità e la loro presenza nel campione di urina come tale o soltanto nell'urina concentrata. Tuttavia la mia esperienza, che posso però riferire sulla base del ricordo, è che i primi siano in effetti spesso un po' meno sensibili dei secondi. Ricordo infatti reazione di debole positività alla BJP visibili con gli anti LC(b&f) su urina intera e con gli anti FLC su urina concentrata e/o ricolorata.

Del resto la valutazione della diversa sensibilità emerge bene nel lavoro della nostre Multicentriche a cui rimando (2) (3).

Ancora a proposito della Cross-Reattività noto che il lavoro di C.R.Tillyer (4) citato nelle linee guida dice che usualmente questo non è un problema riguardante campioni urinari a meno che non ci si trovi di fronte a gravi casi di proteinuria non selettiva. In esso si parla di un potenziale problema di Cross-reazione per siero e CSF e vengono riferiti studi con antisieri Dako, nei quali si sono trovate percentuali di Cross-Reattività nella misura dallo 0,02% allo 0,03% per le kappa e tra lo 0,03% e lo 0,06% per le lambda, contro IgG umane purificate.

Aggiungo ancora che la lettura degli articoli di Tillyer (4) e Boege (5), citati dalle linee guida per sconsigliare i metodi quantitativi di dosaggio delle FLC, è stata veramente interessante e ne proporrei la diffusione, una volta tradotti.

Nel primo vengono dettagliatamente esaminati i numerosi difetti di tutti i sistemi di misurazione delle MC in generale e delle BJP, per concludere in favore di un uso accorto della immunometria con antisieri di buona fonte commerciale, accoppiata al periodico utilizzo della EF per la verifica della monoclonalità.

Il secondo dosa le BJP di nove pazienti in diversi momenti terapeutici con determinazione gravimetrica dopo gel-filtrazione e liofilizzazione; questo dato è poi preso come riferimento e confronto con altri quattro sistemi di misurazione, due dei quali immunometrici. Evidenzia così che, al di fuori del sistema gravimetrico, non è possibile una misurazione delle BJP ovvero un confronto quantitativo tra BJP di individui diversi. Invece nell'ambito dello stesso paziente queste misurazioni intese come unità arbitrarie sembrano poter essere utilizzate e corrispondere alla terapia.

In entrambi i lavori emerge anche la necessità di uno standard internazionale di riferimento.

Le loro conclusioni ci confortano nella strada intrapresa con le multicentriche.

## Bibliografia

1. Graziani MS, Merlini GP, Petrini C.  
Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones  
Gruppo di Studio Proteine – Società Italiana di Biochimica Clinica  
Biochim Clin 2001; 25:23-32
2. Pallotti G. et al.  
Valutazione multicentrica di metodi e protocolli per le Catene Leggere Libere e Proteine di Bence Jones in urine – Primi risultati  
Biochimica Clinica, 19, 1995, pp 410-425
3. Pallotti G. et al.  
Valutazione multicentrica di metodi commerciali di routine per la ricerca delle Proteine di Bence Jones in urine – Primi risultati  
Presentato al Corso CEFAR “Le Proteine: dal Laboratorio alla Clinica” Desenzano, 13 ottobre 1999  
Disponibile presso: New Scientific Company – Via Dante, 35 – I 20032 Cormano (MI)  
Tel +39 02 6152021, Fax +39 02 6152154, e-mail: [nscit@newscientific.com](mailto:nscit@newscientific.com)
4. Tillyer CR.  
The estimation of free light chains of immunoglobulins in biological fluids.  
Int J Clin Lab Res 1992;22:152-8
5. 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

## Tabelle e Figure

Tabella 1		Archivio Laboratorio Osp.le Galliera di Genova - Periodo: '92 - '97 Urine - Rilievo di componenti monoclonali di Ig e/o Frammenti - <b>Pazienti</b>								
Confronto interpretativo tra procedura Galliera e proposta Documento SIBioC 2001										
Schema Galliera Antisieri: - Catene Pesanti - Catene Leggere Totali - Catene Leggere Libere	Parziali (gruppi)					Totali (somme di gruppi)				Totale pazienti
	A	B	C	D	E	A+B+C	B+C	B+C+D	A+B+C+D	
	BJP solitaria	BJP + Ig-mono (due bande separate)	BJP + Ig-mono co-migranti	Ig-mono (no BJP)	Negativi (no CM)	BJP	BJP + Ig-mono	Ig-mono (con e senza BJP)	Totale CM	
Numero pazienti	202	85	20	101	635	307	105	206	408	1043
% su totale C+D			17%	83%						
% su totale BJP	66%	28%	7%			100%	34%			
% su totale CM	50%	21%	5%	25%		75%	26%	50%	100%	
% su totale pazienti	19%	8%	2%	10%	61%	29%	10%	20%	39%	
<b>Schema SIBioC no As Catene Leggere Libere</b>	Pazienti "risolti" Colonne A + B		Pazienti "irrisolti" Colonne C + D		Nel 30% dei casi con CM sarebbe stato necessario <b>ripetere la IFE</b> con gli antisieri anti Catene Leggere Libere					
Numero pazienti	287		121							
% su totale CM	70%		30%							

La tabella riporta i "pazienti" presenti in archivio poiché le ricorrenze del paziente espresse dal numero di campioni, oltre che essere molto variabili per diversissimi fattori, possono essere influenzate dal risultato del primo accertamento

Tabella 2		Archivio Laboratorio Osp.le Galliera di Genova - Periodo: '92 - '97 Urine - Rilievo di componenti monoclonali di Ig e/o Frammenti - <b>Campioni</b>								
Confronto interpretativo tra procedura Galliera e proposta Documento SIBioC 2001										
Schema Galliera Antisieri: - Catene Pesanti - Catene Leggere Totali - Catene Leggere Libere	Parziali (gruppi)					Totali (somme di gruppi)				Totale campioni
	A	B	C	D	E	A+B+C	B+C	B+C+D	A+B+C+D	
	BJP solitaria	BJP + Ig-mono (due bande separate)	BJP + Ig-mono co-migranti	Ig-mono (no BJP)	Negativi (no CM)	BJP	BJP + Ig-mono	Ig-mono	Totale CM	
Numero campioni	464	152	24	149	1021	640	176	325	789	1810
% su totale C+D			14%	86%						
% su totale BJP	73%	24%	3,8%			100%	28%	51%		
% su totale CM	59%	19%	3,0%	19%		81%	22%	41%	100%	
% su totale campioni	26%	8%	1,3%	8%	56%	35%	10%	18%	44%	
<b>Schema SIBioC no As Catene Leggere Libere</b>	Campioni CM "risolti" Colonne A + B		Campioni CM "irrisolti" Colonne C + D		Nel 22% dei casi con CM sarebbe stato necessario <b>ripetere la IFE</b> con gli antisieri anti Catene Leggere Libere					
Numero campioni	616		173							
% su totale CM	78%		22%							





