Ricerca qualitativa e quantitativa delle proteine di Bence Jones

D. Valenti, M. C. Lenzi, P. Mammini

Parole chiave: Proteina di Bence Jones, Componenti monoclonali nelle urine, Catene leggere libere, Catene leggere libere monoclonali.
Key words: Bence Jones protein, Monoclonal components in urine, free light chains, monoclonal free light chains.

ABSTRACT

Qualitative and quantitative evaluation of Bence Jones protein

This study investigates the reliability of some methods for the determination of the Bence Jones protein in urine. Results obtained by HCl precipitation, nephelometric quantitation of kappa and lambda free chains and urine electrophoresis have been compared. Data indicate that the sole use either of the precipitation method or the nephelometric quantitation is insufficient for a proper identification of the Bence Jones protein because of the high number of false negatives and false positive results respectively. On the contrary with electrophoretic methods, the number of false positives and false negatives was significantly reduced, and using PARAGON IFE with ACID VIOLET and PARAGON PROTUR HISI no false negative results occurred. The authors suggest, in choosing the method, to consider carefully the greater engagement of specialized personnel needed to run electrophoresis. The AA propose the use of the nephelometric method for screening, even if it is rather expensive. The presence of Bence Jones protein has then to be ascertained by the IFE method.

RIASSUNTO

La ricerca che abbiamo condotto consiste in uno studio sulla sensibilità ed affidabilità di alcune tecniche impiegate nella determinazione della proteinuria di Bence Jones. Sono stati confrontati i risultati ottenuti dall’utilizzazione del test di precipitazione, del metodo nefelometrico e delle tecniche elettiroforetiche. I dati da noi raccolti indicano che il solo impiego del test di precipitazione e dell’immunonefelometria è insufficiente per una corretta identificazione della proteina di Bence Jones. Infatti il test di precipitazione presenta un numero considerevole di falsi negativi mentre l’immunonefelometria mostra un numero elevato di falsi positivi. L’impiego...
di metodi elettroforetici consente di ottenere risultati più soddisfacenti poiché riduce notevolmente il numero dei falsi positivi e negativi; questi ultimi sono addirittura assenti con le metodiche PROTUR ed ACID VIOLET. Gli AA fanno notare che le tecniche elettroforetiche richiedono un notevole impegno tecnico per cui la scelta dei metodi da utilizzare deve essere attentamente valutata e comunque, per la loro esperienza, indicano l’uso della nefelometria come test di screening, anche se molto costoso, e raccomandano l’uso dell’IFE come metodo di conferma.

INTRODUZIONE

Le proteine di Bence Jones sono componenti monoclonali costituite dalle catene leggeri libere κ e lambda delle immunoglobuline. Si trovano, praticamente pure ed in grandi quantità, nelle urine escrete da pazienti con malattie immunoproliferative ed iperimmuni. La proteinuria di Bence Jones è spesso presente nel mieloma multiplo, nella macroglobulinemia di Waldenstrom e nella amiloidosi ed è la causa dell’insufficienza renale ad esse collegata; meno frequentemente la troviamo associata ad altre malattie linfoproliferative come linfomi e leucemie linfatiche croniche e raramente si riscontra in neoplasie non linfoproliferative. Comunque la presenza delle proteine di Bence Jones non sempre determina il danno renale poiché questo è legato a più fattori, alcuni propri delle proteine ed altri determinati dallo stato dell’ospite. I fattori protettici sono legati alla struttura della porzione variabile che determina molte delle caratteristiche chimico-fisiche della molecola. I fattori predispensori dell’ospite sono: la disidratazione, l’ipercalemia, l’iperuricemia, le infezioni del tratto urinario, i farmaci nefrotossici ed i mezzi di contrasto. Questi fattori sono molto importanti ed in particolare la disidratazione e l’ipercalemia sono capaci di determinare l’insufficienza renale anche in presenza di proteine che da sole non ne hanno la facoltà.

La ricerca della proteinuria di Bence Jones consente di diagnosticare malattie immunoproliferative, di seguire l’evoluzione e l’efficacia della terapia. Inoltre tale ricerca è, oggi, richiesta dai radiologi in tutti i pazienti che devono essere sottoposti ad esami contrastografici. Le proteine di Bence Jones sono determinate con le più varie tecniche, dalla precipitazione al calore o all’acidificazione, alle quali, ormai, si può riconoscere solo un valore storico, alle più sofisticate e moderne, come l’immunonefelometria, l’elettroforesi e l’immunofissazione, caratterizzate da elevata sensibilità e specificità. Lo scopo della nostra ricerca è quello di confrontare la sensibilità e l’affidabilità di alcune metodiche impiegate per l’identificazione delle catene leggere monoclonali nelle urine, assumendo a metodo di riferimento l’immunofissazione (IFE).

MATERIALI E METODI

I campioni esaminati provengono da pazienti ambulatoriali e specializzati con richieste specifiche di ricerca delle proteine di Bence Jones o di elettroforesi delle proteine urinarie.

Tutti i campioni, dopo centrifugazione, sono sottoposti al dosaggio quantitativo delle catene leggere libere con il nefelometro automatico APS (BECKMAN) e antiseri della ditta NEW SCIENTIFIC COMPANY. Le concentrazioni delle catene leggere libere kappa e lambda sono ricavate da curve di calibrazione, ottenute sfruttando opportunamente gli standard contenuti nei kit, concentrazione dichiarata di 20 mg/dL con punto iniziale a 1 mg/dL, seguendo le indicazioni consigliate dalla metodica originale della ditta. Le urine dei pazienti con sola richiesta di ricerca di proteine di Bence Jones sono analizzate anche con il test della precipitazione con acido cloridrico. I campioni che risultano positivi all’esame nefelometrico, e tutti i campioni con richieste di elettroforesi delle proteine urinarie sono concentrati da 50 a 100 volte, a seconda delle quantità di proteine presenti, utilizzando i concentratori MINICON (AMICON) e sottoposti ad elettroforesi con l’apparecchiatura automatica JOOKOO CTE 150 con strisce di acetato di celulosa, tampone a pH 9,25 e colorante Rosso Ponceau (apparecchiature e reagenti CHEMTRON), con tempo di migrazione scelto di 27 minuti e 0,8 mA di corrente.

I tracciati elettroforetici sono lasciati asciugare all’aria e sottoposti ad ispezione visiva per il riconoscimento delle eventuali componenti monoclonali non evidenziate dal grafico elettroforetico...
Valutazione della proteina di Bence Jones

### Tabella I

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th></th>
<th></th>
<th></th>
<th></th>
<th></th>
<th></th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Acidif. 1233</td>
<td>1</td>
<td>1232</td>
<td>11</td>
<td>1222</td>
<td>0</td>
<td>10</td>
</tr>
<tr>
<td>Nefel. 1233</td>
<td>127</td>
<td>1066</td>
<td>11</td>
<td>1222</td>
<td>116</td>
<td>0</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Results of testing by HCl precipitation and by nephelometry of urines submitted for research of Bence Jones protein.

### Tabella II

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th></th>
<th></th>
<th></th>
<th></th>
<th></th>
<th></th>
<th></th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Dosaggio Nefel. Lambda libere</td>
<td>199</td>
<td>158</td>
<td>41</td>
<td>26</td>
<td>173</td>
<td>134</td>
<td>2</td>
</tr>
<tr>
<td>Elettrof. urina concentr. Rosso Ponceau</td>
<td>195</td>
<td>38</td>
<td>157</td>
<td>26</td>
<td>169</td>
<td>18</td>
<td>6</td>
</tr>
<tr>
<td>Elettrof. urina concentr. Paragon Ac. Violet</td>
<td>38</td>
<td>7</td>
<td>31</td>
<td>4</td>
<td>34</td>
<td>3</td>
<td>0</td>
</tr>
<tr>
<td>Elettrof. urina non concentr. (Protur)</td>
<td>123</td>
<td>24</td>
<td>99</td>
<td>17</td>
<td>106</td>
<td>7</td>
<td>0</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Results of the search of Bence Jones protein on urines sent for urinary proteins electrophoresis and of urines studied by the nephelometric procedure. True and false negatives and positives refer to the results obtained by IFE as the reference method.

Ottenuto dalla lettura densitometrica automatizzata, in alcuni campioni, scelti in modo del tutto casuale tra i campioni con richiesta di elettroforesi della proteinuria o con richiesta di ricerca della proteina di Bence Jones con concentrazioni di catene leggere libere dosabili al nefelometro, sono state eseguite le elettroforesi su urine concentrate, utilizzando lastrine di gel-agarosio e tampone a pH 8,6 del kit IFE PARAGON (BECKMAN), tempo di migrazione di 32 minuti a 100 volts di tensione e colorante Acid Violet (BECKMAN); anche in questo caso, le strie sono state ottenute ad ispezione visiva.

Seguendo le indicazioni riportate sopra, abbiamo scelto i campioni per l'elettroforesi sulle urine non concentrate utilizzando il kit PROTUR HISI (BECKMAN).

Tutti i campioni con bande sospette nei tracciati elettroforetici sono sottoposti ad immunoassaysa con il kit PROTUR PLUS (BECKMAN) utilizzando anche in questo caso urine non concentrate.

### RISULTATI

Nel corso della nostra indagine abbiamo esaminato 1233 campioni per la ricerca della proteina di Bence Jones, sui quali abbiamo eseguito il dosaggio nefelometrico delle catene K e lambda libere e abbiamo confrontato i risultati con quelli ottenuti con il metodo tradizionale della precipitazione con acido cloridrico, tabella 1. Nella tabella tutti i campioni positivi hanno concentrazioni di catene leggere libere maggiori di 1 mg/dl.

Nella tabella 2 sono sintetizzati i risultati dei
DISCUSSIONE

La tabella 1 evidenzia la diversa sensibilità tra il metodo nefelometrico e l'acidificazione con acido cloridrico; quest'ultima risulta troppo poco sensibile dato l'alto numero di falsi negativi, 10 su 11, mentre il dosaggio nefelometrico delle catene libere k e lambda presenta una aspecificità molto marcata con 116 falsi positivi su 11 realmente documentati.

I dati riportati nella tabella 2, evidenziano, ancora una volta, l'alto numero di falsi positivi del metodo nefelometrico, ma dobbiamo anche rilevare il basso numero di falsi negativi.

I falsi positivi in 21 casi sono dovuti alla presenza di catene leggere libere polielettroniche, per i rimanenti non abbiamo raccolto dati certi ma pensiamo che in parte essi siano dovuti alla inferiore sensibilità (circa 5 mg/dL) della metodica IFE da noi utilizzata rispetto alla tecnica nefelometrica, ed in parte, alla presenza di farmaci e/o alte concentrazioni di sali che, in alcuni casi, in presenza dell'antisiero danno luogo a formazioni di torbidità aspecifiche ed in altri casi impediscono la formazione del complesso antigene-anticorpo. Dobbiamo evidenziare che, probabilmente, nell'intervallo compreso tra le differenti sensibilità, 5 mg/dL per l'IFE e 1 mg/dL per la nefelometria, vengono a trovarsi molti dei casi di eliminazione di catene libere monoclonali transitorie dovute a particolari situazioni fisiologiche (AGUZZI F. comunicazione orale). Le metodiche elettroforetiche hanno comportamenti diversi, sia tra loro, che rispetto alla nefelometria. La metodica automatizzata (colorante Rosso Ponceau) presenta rispetto alla nefelometria un numero di falsi positivi inferiore ma anche un numero maggiore di falsi negativi, mentre, rispetto agli altri metodi elettroforetici, presenta sia un numero maggiore di falsi positivi che di falsi negativi, dato che questi, con le altre tecniche elettroforetiche sono addirittura assenti.

Abbiamo ricercato le cause che determinavano l'errore con le tecniche elettroforetiche e per far ciò abbiamo correlato la presenza delle proteine nei campioni con l'errato riconoscimento della proteina di Bence Jones. Infatti, i falsi positivi ottenuti con l'elettroforesi sono sempre dovuti a proteine che simulano la presenza della proteina, ed in particolare, con il Rosso Ponceau in 5 casi abbiamo evidenziato la presenza di immunglobuline monoclonali, in 7 casi di microglobuline e per i restanti di transferina o di alfa-1-antitripsina; per l'Acid Violet lo scambio è avvenuto una volta con le microglobuline, una volta con la transferrina ed una volta con l'alfa-1-antitripsina. Con le urine non concentrate per 5 volte si trattava di immunglobuline monoclonali e per due volte di microglobuline.

Abbiamo trovato inoltre che, in presenza di alterazioni glomerulari e miste con elevate proteinurie, il Rosso Ponceau, per la sua specificità di rendere meno evidenti le proteine a bassa concentrazione rispetto agli altri coloranti utilizzati, non permette di riconoscere sempre la presenza delle proteine di Bence Jones. In un caso non è stato possibile correlare il motivo di questo errore col tipo di proteine presenti; quanto osservato può essere dovuto al fatto che le catene leggere libere di quel campione avevano un peso molecolare inferiore a 15000 Daltons e potevano passare attraverso la membrana del MINICON al momento della concentrazione con il risultato di non essere più determinabili.

CONCLUSIONI

L'uso di tecniche particolarmente sensibili e specifiche permette l'identificazione della proteinuria di Bence Jones anche nei casi in cui sono presenti moderate concentrazioni di catene leggere monoclonali, ciò consente di prevenire l'insistarsi dello stato di insufficienza renale che spesso viene diagnosticato tardivamente, quando ormai, la funzionalità renale è compromessa.

I dati da noi raccolti evidenziano che il metodo tradizionale della precipitazione con acido cloridrico è, a causa della sensibilità estremamente bassa, inadeguato per una diagnosi corretta.

Il dosaggio nefelometrico delle catene libere k e lambda ha un livello di sensibilità elevato e la caratteristica di essere di facile esecuzione ed estremamente rapido, ma presenta una percentuale di falsi positivi molto grande.

I metodi elettroforetici sia per sensibilità che
per specificità sono più affidabili ma sono anche più lenti, per la necessità di concentrare il campione e per la maggiore manovrabilità. Il PARAGON PROTUR HISI è risultato il più affidabile ed è il più veloce tra i metodi elettroforetici in quanto non necessita della concentrazione delle urine.

La scelta dei metodi per la ricerca delle proteine di Bence Jones deve, a nostro parere, tenere conto, oltre che delle caratteristiche e delle differenze nei risultati ricordate sopra, anche del fatto che i metodi elettroforetici richiedono un impegno tecnico rilevante da parte di personale specializzato.

Dato l’alto numero di richieste di ricerca di proteine di Bence Jones, riteniamo sia utile prendere l’impiego di un metodo di screening per il loro riconoscimento. Questo deve avere le caratteristiche di essere di facile esecuzione, a basso costo e necessariamente con basso numero di falsi negativi. Fra i metodi esaminati quello, che per la nostra esperienza, si avvicina di più ai requisiti richiesti per un metodo di screening è l’immunofenelometria, anche se, non risponde al requisito di economicità. Riteniamo che le IFE ed in particolare il kit PROTUR PLUS, che utilizza urine non concentrate, debbano essere utilizzate come metodi di conferma anche se questi non sono di facile esecuzione ed hanno costo elevato.

BIBLIOGRAFIA