

Barcelona, octubre de 2004

**2^{as} reuniones inter-regionales sobre:
Proteínas de Bence Jones y Cadenas Ligeras Libres
Memorándum**

Introducción: objetivo, método y muestras

El objetivo general de las reuniones inter-regionales es el avanzar progresivamente en la estandarización y uniformización de la determinación de la Proteína de Bence Jones (BJP). Dicha estandarización, como pusieron de evidencia las reuniones anteriores, esta lejos de alcanzarse en el laboratorio actual .

Se ha seguido el mismo método empleado desde el inicio por los grupos de estudio, consistente en trabajos de experimentación multicéntrica seguidos por reuniones zonales en las que se discuten los resultados y se programan los estudios sucesivos. En esta segunda ocasión a los grupos de las zonas "Castilla-Madrid" y "Catalunya", que participaron en la primera serie de reuniones, se han añadido participantes de dos nuevas zonas, la zona "Norte" (Aragón-Asturias-Cantabria-Euskadi-Navarra-Rioja) y la zona "Galiza".

El fruto principal de la primera experimentación (2003) fué el poner en evidencia la falta de estandarización de la determinación de las BJP y potenciar el interés necesario entre los participantes para avanzar hacia ella. Para ello los grupos decidieron proceder al estudio de cuatro muestras con BJP, dos Kappa y dos Lambda, del mismo origen que las muestras anteriormente analizadas pero con concentraciones mayores (en un escalado dentro del rango de 1 y 5 mg/dl (10-50 mg/l)) para intentar conseguir más información sobre las sensibilidades típicas de cada metódica; las muestras analizadas y sus concentraciones (obtenidas a posteriori) son las siguientes:

Muestra :	BJP - lambda "Bellaria"		BJP - kappa "Lavagna"	
Dilución :	C	D	E	F
Concentración : mg / dl	4.6	2.5	3.0	0.8

Sobre estas muestras, además de efectuar el estudio completo de la BJP con todos y cada uno de los métodos que cada laboratorio estuviere empleando cotidianamente, se propuso a los participantes que:

- con las métodos electroforéticas, se procediese al análisis de las muestras concentradas y sin concentrar,
- y, con la nefelometría, se cuantificasen también las muestras concentradas.

Dicha propuesta fue motivada por la sospecha, apuntada en el debate de las reuniones anteriores, de que el paso de la concentración de las muestras podía tener una gran influencia en el resultado final.

Los Invitados:

El número de Laboratorios invitados a participar en la experimentación y las reuniones fué de 70, distribuidos como sigue:

Zona “Norte”:	22 invitados
Zona “Castilla-Madrid”:	18 invitados
Zona “Catalunya”:	19 invitados
Zona “Galiza”:	9 invitados
Otros:	2 invitados (de Canarias)

Los Participantes

Definimos como participantes aquellos Laboratorios, 45 en total, que participaron en la experimentación reportando los resultados obtenidos.

Zona “Norte”:	14 participantes
Zona “Castilla-Madrid”:	11 participantes
Zona “Catalunya”:	11 participantes
Zona “Galiza”:	7 participantes
Otros:	2 participantes (de Canarias)

Los Asistentes

Los asistentes a las distintas reuniones zonales fueron los relacionados a continuación:

Zona "Norte" - Donosti, 29 Abril 2004

Hospital de Navarra (Pamplona)	Lab. Bioquímica
Hospital Virgen del Camino (Pamplona)	Lab. Bioquímica
Hospital de Cruces (Barakaldo)	Lab. Bioquímica
Hosp. Ntra. Sra. de Aránzazu (Donosti)	Lab. Inmunología
Hospital de Bidasoa (Hondarribia)	Lab. Bioquímica
Clínica Universitaria de Navarra (Pamplona)	Lab. Bioquímica
Hospital San Eloy (Barakaldo)	Lab. Bioquímica
Hospital Marqués de Valdecilla (Santander)	Lab. Bioquímica

Zona "Castilla-Madrid" - Madrid, 18 Mayo 2004

Hospital de Guadalajara	Lab. Bioquímica
Hospital Gregorio Marañón (Madrid)	Lab. Inmunología
Hospital Ramón y Cajal (Madrid)	Lab. Inmunología
Hospital Clínico San Carlos (Madrid)	Lab. Bioquímica
Hospital de Getafe	Lab. Bioquímica
Comp. Hospitalario de Toledo	Lab. Bioquímica
Hospital del Río Hortega (Valladolid)	Lab. Bioquímica
Hosp. Ntra. Sra. de Sónsoles (Avila)	Lab. Bioquímica
UniLabs - Fundación Jiménez Díaz (Madrid)	Lab. Inmunología
Hospital General de Segovia	Lab. Bioquímica
CNIC Carlos III (Madrid)	Serv. Laboratorio
más, de otras zonas,	
Hosp. de Gran canaria Dr. Negrín (Las Palmas)	Lab. Bioquímica
Hospital Miguel Servet (Zaragoza)	Lab. Hematología

Zona "Catalunya" - Barcelona, 20 Mayo 2004

Hospital Josep Trueta (Girona)	Lab. Bioquímica
Hospital Joan XXIII (Tarragona)	Lab. Bioquímica
Hospital Verge de la Cinta (Tortosa)	Lab. Bioquímica
Fundació Puigvert - IUNA (Barcelona)	Serv. Laboratorio
Hospital Parc Taulí (Sabadell)	Lab. Bioquímica
Hosp. de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona))	Lab. Bioquímica
Hospital de la Vall d'Hebrón (Barcelona)	Lab. Bioquímica
Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona)	Lab. Inmunología
CAP Just Oliveras (Barcelona)	Serv. Laboratorio
Hosp. Duran i Reynals (Bellvitge-Barcelona)	Lab. Inmunología
más, de otras zonas,	
Hospital Doctor Peset (Valencia)	Lab. Bioquímica

Zona "Galiza" - A Coruña, 7 Octubre 2004

Hospital Clínico Universitario (Santiago de C.)	Lab. Inmunología
Hospital Arquitecto Marcide (El Ferrol)	Lab. Bioquímica
Hosp. General provincial de Pontevedra	Lab. Bioquímica

A las distintas reuniones asistieron también representantes de las casas comerciales **Dade Behring, Izasa y Sebia**, a los que aprovechamos la ocasión para agradecer su colaboración y aportaciones al debate.

Los Resultados:

Los resultados obtenidos clasificados por tipos de métodos fueron, en extrema síntesis, los siguientes:

NEFELOMETRÍA - ANTISUEROS ANTI CADENAS LIGERAS LIBRES (17 LABORATORIOS (11 NEF. SERIE BN - 6 NEF. IMG))						
MUESTRA →		LAMBDA C	LAMBDA D	KAPPA E	KAPPA F	TODAS
TOTAL	TOTAL	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	120 (100%)
	POSITIVOS	30 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	29 (100%)	119 (99%)
	NEGATIVOS	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0%)	1 (1%)
SERIE BN	TOTAL	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	80 (100%)
	POSITIVOS	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	19 (95%)	79 (99%)
	NEGATIVOS	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	1 (1%)
IMMAGE	TOTAL	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	40 (100%)
	POSITIVOS	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	40 (100%)
	NEGATIVOS	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

NEFELOMETRÍA - ANTISUEROS ANTI CADENAS LIGERAS TOTALES (B & F) (26 LABORATORIOS (11 NEF. SERIE BN - 15 NEF. IMG))						
MUESTRA →		LAMBDA C	LAMBDA D	KAPPA E	KAPPA F	TODAS
TOTAL	TOTAL	53 (100%)	53 (100%)	53 (100%)	53 (100%)	212 (100%)
	POSITIVOS	50 (94%)	50 (94%)	50 (94%)	50 (94%)	200 (94%)
	NEGATIVOS	3 (6%)	3 (6%)	3 (6%)	3 (6%)	12 (6%)
SERIE BN	TOTAL	22 (100%)	22 (100%)	22 (100%)	22 (100%)	88 (100%)
	POSITIVOS	22 (100%)	22 (100%)	22 (100%)	22 (100%)	88 (100%)
	NEGATIVOS	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
IMMAGE	TOTAL	31 (100%)	31 (100%)	31 (100%)	31 (100%)	124 (100%)
	POSITIVOS	28 (90%)	28 (90%)	28 (90%)	28 (90%)	112 (90%)
	NEGATIVOS	3 (10%)	3 (10%)	3 (10%)	3 (10%)	12 (10%)

NOTA:

La clasificación como "Positivo", en las metodicas cuantitativas, hace referencia a la obtención de un resultado claramente superior al "cero" o al límite de detección típico de la metódica, lo cual es indicativo de la posible presencia de BJP.

ELECTROFORESIS						
(25 LABORATORIOS (23 MUESTRAS CONCENTRADAS - 20 MUESTRAS SIN CONCENTRAR))						
	MUESTRA →	LAMBDA C	LAMBDA D	KAPPA E	KAPPA F	TODAS
TOTAL	TOTAL	63 (100%)	62 (100%)	63 (100%)	63 (100%)	251 (100%)
	POSITIVOS	21 (33%)	17 (27%)	6 (10%)	3 (5%)	47 (19%)
	NEGATIVOS	42 (67%)	45 (73%)	57 (90%)	60 (95%)	204 (81%)
CONCENTR.	TOTAL	34 (100%)	34 (100%)	34 (100%)	34 (100%)	136 (100%)
	POSITIVOS	11 (32%)	10 (29%)	5 (15%)	3 (9%)	29 (21%)
	NEGATIVOS	23 (68%)	24 (71%)	29 (85%)	31 (91%)	107 (79%)
No CONC.	TOTAL	29 (100%)	28 (100%)	29 (100%)	29 (100%)	115 (100%)
	POSITIVOS	10 (34%)	7 (25%)	1 (3%)	0 (0%)	18 (16%)
	NEGATIVOS	19 (66%)	21 (75%)	28 (97%)	29 (100%)	97 (84%)

INMUNOFIJACIÓN - ANTISUEROS ANTI CADENAS LIGERAS LIBRES						
(26 LABORATORIOS (22 MUESTRAS CONCENTRADAS - 20 MUESTRAS SIN CONCENTRAR))						
	MUESTRA →	LAMBDA C	LAMBDA D	KAPPA E	KAPPA F	TODAS
TOTAL	TOTAL	53 (100%)	53 (100%)	52 (100%)	53 (100%)	211 (100%)
	POSITIVOS	44 (83%)	39 (75%)	17 (33%)	8 (15%)	108 (51%)
	NEGATIVOS	9 (17%)	14 (26%)	35 (67%)	45 (85%)	103 (49%)
CONCENTR.	TOTAL	29 (100%)	29 (100%)	28 (100%)	29 (100%)	115 (100%)
	POSITIVOS	28 (97%)	23 (79%)	13 (46%)	6 (21%)	70 (61%)
	NEGATIVOS	1 (3%)	6 (21%)	15 (54%)	23 (79%)	45 (39%)
No CONC.	TOTAL	24 (100%)	24 (100%)	24 (100%)	24 (100%)	96 (100%)
	POSITIVOS	16 (67%)	16 (67%)	4 (17%)	2 (8%)	38 (40%)
	NEGATIVOS	8 (33%)	8 (33%)	20 (83%)	22 (92%)	58 (60%)

INMUNOFIJACIÓN - ANTISUEROS ANTI CADENAS LIGERAS TOTALES (B & F)						
(37 LABORATORIOS (32 MUESTRAS CONCENTRADAS - 23 MUESTRAS SIN CONCENTRAR))						
	MUESTRA →	LAMBDA C	LAMBDA D	KAPPA E	KAPPA F	TODAS
TOTAL	TOTAL	68 (100%)	69 (100%)	64 (100%)	65 (100%)	266 (100%)
	POSITIVOS	55 (81%)	44 (64%)	37 (58%)	20 (31%)	156 (59%)
	NEGATIVOS	13 (19%)	25 (36%)	27 (42%)	45 (69%)	110 (41%)
CONCENTR.	TOTAL	40 (100%)	41 (100%)	36 (100%)	37 (100%)	154 (100%)
	POSITIVOS	37 (93%)	28 (68%)	22 (61%)	11 (30%)	98 (64%)
	NEGATIVOS	3 (8%)	13 (32%)	14 (39%)	26 (70%)	56 (36%)
No CONC.	TOTAL	28 (100%)	28 (100%)	28 (100%)	28 (100%)	112 (100%)
	POSITIVOS	18 (64%)	16 (57%)	15 (54%)	9 (32%)	58 (52%)
	NEGATIVOS	10 (36%)	12 (43%)	13 (46%)	19 (68%)	54 (48%)

NOTA:

La clasificación como "Positivo", en las metodicas electroforéticas, hace referencia a la observación de una "banda homogénea", por débil que esta fuese.

En lo referente a las prueba nefelométricas realizadas para controlar la efectividad de la concentración de las muestras los resultados fueron los siguientes:

Resultados NEFELOMETRIA MUESTRAS CONCENTRADAS - DETALLE															
Centro	Método	Factor Teórico	Lambda "C" - mg/dl			Lambda "D" - mg/dl			Kappa "E" - mg/dl			Kappa "F" - mg/dl			
			Conc.	No Conc.	Conc. Ef.	Conc.	No Conc.	Conc. Ef.	Conc.	No Conc.	Conc. Ef.	Conc.	No Conc.	Conc. Ef.	
1	CLL - IMG	x 10	56,80	6,11	9,30	29,70	2,95	10,07	8,00	1,47	5,44	1,33	0,58	2,29	
1	CLT - IMG	x 10	97,90	14,50	6,75	50,60	7,16	7,07	46,40	11,10	4,18	5,09	2,90	1,76	
2	CLT - BN	x 20	23,90	5,64	4,24	7,44	3,30	2,25	8,94	3,07	2,91	inf. R.E.	0,88	< 1	
3	CLL - BN	x 25										1,00	0,67	1,49	
4	CLL - BN	x 10	12,20	4,30	2,84	6,20	2,60	2,38	2,39	2,90	0,82	0,86	0,95	0,91	
5	CLT - BN	x 50	32,08	5,20	6,17	7,98	3,38	2,36	inf. R.E.	3,25	< 1				
6	CLT - BN	x 50				6,96	3,09	2,25	3,12	3,23	0,97	0,81	0,78	1,04	
7	CLT - BN	x 50	39,10	5,35	7,31	24,40	3,19	7,65	5,56	3,18	1,75	0,87	1,00	0,87	
8	CLL - BN	x4(L) - x5(K)				8,00	2,70	2,96				5,00	0,74	6,76	

NOTA:

La tabla relaciona los resultados de las medidas nefelométricas, obtenidas con distintos métodos, antes y después de la concentración de las muestras, así como el factor de concentración efectivamente obtenido comparado con el esperado.

Y, en lo referente a la precisión inter-laboratorio del resultado cuantitativo obtenido con la nefelometría:

Resultados Cuantitativos NEFELOMETRIA - DETALLE PRECISION				
	n	media	desv. std.	c. v.
Lambda C	79	4,65	0,7072	15,2 %
Lambda D	79	2,53	0,4772	18,8 %
Kappa E	79	3,00	0,5186	17,3 %
Kappa F	79	0,83	0,1523	18,5 %

NOTA:

La tabla relaciona conjuntamente la media y desviación de los resultados obtenidos con **cuatro métodos distintos**:

- Nefelómetro "Serie BN" con As. CLT (B&F) "Dade Behring"
- Nefelómetro "Image" con As. CLT (B&F) "Beckman Coulter" (div. 3,33)
- Nefelómetro "Serie BN" con As. CLL "NSC"
- Nefelómetro "Image" con As. As. CLL "NSC"

El Debate:

El planteamiento básico de las reuniones de que, al menos en términos de positivo/negativo (es decir señalización de presencia/ausencia), todos los métodos que se emplean en el estudio de la BJP deberían dar resultados coincidentes, como requisito indispensable para la transportabilidad de los resultados obtenidos, no fue discutido por estar los participantes de acuerdo en esta premisa.

A la vista de los resultados presentados, la discusión en las distintas reuniones se centró de una manera bastante común en los siguientes temas generales:

- Las características de las muestras examinadas: origen, concentración, conservación, etc.
- Las causas técnicas y motivos de la ineficiencia de la concentración (en el ámbito de las muestras examinadas), así como la conveniencia o no de concentrar la orina para el estudio de la BJP.
- La sensibilidad requerida en el estudio de la BJP, es decir, ¿cuál es la mínima cantidad de BJP que es preciso detectar y/o es clínicamente significativa?
- La necesidad de avanzar en la estandarización y homogeneización de las métodos electroforéticos (EF e IFE) con el objetivo de obtener resultados más coincidentes.

También se discutió en algunas reuniones, aunque menos, sobre aspectos de tipo más práctico como:

- Tipo de muestra a emplear en el estudio de la BJP: ¿orina de 24 horas o extemporánea?, ¿cómo conservarla?, etc.
- La aportación del uso de antisueros anti Cadenas Ligeras Libres, tanto en la IFE como en la nefelometría.

Las Conclusiones y Propuestas:

Se acordó continuar los estudios con unas nuevas muestras que preferentemente deberán ser aportadas por los propios participantes. Para ello, quién encuentre una orina con una cantidad importante de BJP (más de 100 mg/dl), y pueda disponer de una cantidad suficiente (aprox. 0,5 litros), avisará a NSC quién se encargará de la recogida y del posterior tratamiento y distribución de las muestras.

Se acordó que las muestras, una vez diluidas, deberán tener unas concentraciones aproximadas de 2 - 5 - 10 mg/dl y se distribuirán al menos 20ml de cada una de ellas.

Los test a efectuar son (siempre que se usen rutinariamente en el laboratorio): Proteínas Totales, Electroforesis, Inmunofijación y Nefelometría. Para ello, las muestras deberán concentrarse, o no, siguiendo el protocolo o criterio que use habitualmente cada laboratorio.

Dado que en la discusión de la mesa redonda se encontró a faltar más información sobre cómo cada participante usaba las distintas metódicas, se acordó que en la recogida de resultados de la nueva experimentación se sería más estricto y se intentaría recopilar el máximo de información posible sobre las metódicas empleadas, y sus posibles variaciones o particularizaciones. El objetivo que con ello se pretende es clasificar mejor los resultados obtenidos y ver cómo la ejecución de las metódicas puede afectarlos, como paso previo necesario para avanzar en su estandarización.

Un punto central en la discusión fue ¿cual es la mínima cantidad significativa de BJP que el laboratorio debe ser capaz de detectar?. Dado que las opiniones fueron variadas y muchos de los participantes manifestaron no tener suficiente información para pronunciarse, se acordó que:

- NSC se encargará de recopilar bibliografía que se expondrá en las próximas reuniones (para ello se agradecerá a los participantes la señalización de aquellos artículos que consideren interesantes)
- Los participantes intentarán implicar a los clínicos de sus centros para que se pronuncien al respecto y a ser posible que asistan y participen en las próximas reuniones exponiendo su punto de vista.