

EVALUACION MULTICENTRICA DE METODOS Y PROTOCOLOS PARA LAS CADENAS LIGERAS LIBRES Y PROTEINAS DE BENCE JONES EN ORINA - PRIMEROS RESULTADOS

- (1) M. G. MILANESI, L. PENSABENI, F. TURRA
- (2) M. MARTELLI
- (3) R. ZANNINI
- (4) A. CUCCI
- (5) T. D'ATENA, S. ZUFFA
- (6) R. BILANCONI
- (7) T. BETTI, P. MENOZZI
- (8) G. CENNI, N. FARINA, C. GOLLINI
- (9) L. CANDI
- (10) G. PALLOTI, L. PEZZI
- (11) A. CASONI, G. GROSSI, F. GUIDETTI, L. ROVERI, W. TIZZANINI
- (12) F. TIRELLI, R. ZANNI
- (13) M. ACETOSO, L. CECCAROLI
- (14) E. CROCI, E. PANTANO
- (15) M. LUCHERINI, D. VALENTI
- (16) M. TOFOLUTTI
- (17) A. ARGENTO
- (18) E. GIORDANI
- (19) A. SICA
- (20) L. MASSARO, R. SCARINGI

- (1) *Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Bentivoglio (BO)*
- (2) *Laboratorio Analisi, Bologna*
- (3) *Farmacia, Bologna*
- (4) *Laboratorio Analisi, Ospedale Maggiore, Bologna*
- (5) *Laboratorio Analisi, Ospedale Malpighi, Bologna*
- (6) *Laboratorio Analisi, Ospedale Bufalini, Cesena (FO)*
- (7) *Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Correggio (RE)*
- (8) *Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Faenza (RA)*
- (9) *Laboratorio Analisi, Arcispedale San'Anna, Ferrara*
- (10) *Laboratorio Analisi, Ospedale Pierantoni, Forlì*
- (11) *Laboratorio Analisi, Ospedale Policlinico, Modena*
- (12) *Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Ostiglia (MN), Ospedale S. Salvatore*
- (13) *Laboratorio Analisi, Pesaro*
- (14) *Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Piacenza*
- (15) *Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Pistoia*
- (16) *Microbiologia, Ospedale Civile, Pordenone*
- (17) *Laboratorio Analisi, Ospedale Infermi, Rimini*
- (18) *Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Rovereto (TN)*
- (19) *Laboratorio Analisi, Ospedale Civile, Trento*
- (20) *Ricerca e Sviluppo, New Scientific Company, Cormanò (MI)*

Sumario

El objetivo del grupo de estudio es verificar la posibilidad de uniformizar la valoración, interpretación y expresión del informe, de las Proteínas de Bence Jones (BJP) y, más genéricamente, de las Cadenas Ligeras Libres (CLL) en orina.

Se presentan los primeros resultados obtenidos en la evaluación multicéntrica y multimetodológica de diluciones escalares de una muestra de orina con BJP lambda.

Se evidencia a priori, al menos en el ámbito de la muestra examinada y de los métodos empleados, lo siguiente:

- la nula fiabilidad de la determinación de las Proteínas Totales en orina.
- la inesperada relativamente baja sensibilidad de la Electroforesis coloreada con Oro Coloidal, al menos para los kits comerciales empleados.
- la discreta sensibilidad de la Electroforesis con los kits para "orina no concentrada".
- la buena sensibilidad de la Inmunofijación, tanto con antisueros anti Cadenas Ligeras Totales, como con antisueros específicos anti Cadenas Ligeras Libres.
- los buenos resultados en términos de sensibilidad y precisión (en la serie, entre series y entre laboratorios) obtenidos con la Nefelometría, tanto con reactivos para las Cadenas Ligeras Totales, como con reactivos específicos directos para las Cadenas Ligeras Libres.

Surge la necesidad de definir para las BJP y, más genéricamente, para las CLL, "muestras de control" que permitan uniformizar su valoración, al menos en términos de "positivo/negativo"; será también necesario intentar uniformizar el "tipo de muestra" y los distintos aspectos de la "expresión del informe".

Para alcanzar tales objetivos es nuestra intención continuar en la estrategia de la comparación multicéntrica y multimetodológica que refleja, al verse influenciada por ellas cotidianamente, las distintas realidades dimensionales, estructurales y organizativas de cada Laboratorio.

Palabras Clave

Nefelometría, Electroforesis, Inmunofijación, Inmunolectroforesis, Proteínuria, Mieloma, Medios de Contraste.

Abreviaturas

- AL Amiloidosis de Cadenas Ligeras
- BJP Proteínas de Bence Jones (Bence Jones Proteins)
- CL Cadenas Ligeras
- CLL Cadenas Ligeras Libres
- CLT Cadenas Ligeras Totales - Libres & Ligadas - Ig-Ligeras
- CLLM Cadenas Ligeras Libres Monoclonales
- CLLP Cadenas Ligeras Libres Policlonales
- CV Coeficiente de Variación
- EF Electroforesis
- FG Filtrado Glomerular
- Ig Inmunoglobulinas
- IEP Inmunolectroforesis
- IFE Inmunofijación
- IPL Inmunoprecipitación en Fase Líquida
- MGUS Gammapatía Monoclonal de Significado Incierto
- PT Proteínas Totales

Presentación

Este trabajo relaciona de manera resumida los contenidos (programas de estudio acordados y resultados obtenidos) de las reuniones informales a libre debate, celebradas en Forlì el 28 de mayo de 1993, el 15 de octubre de 1993 y el 8 de abril de 1994, sobre el argumento: "Proteínas de Bence Jones y Cadenas Ligeras Libres".

INTRODUCCIÓN

Las Cadenas Ligeras Libres (CLL), al igual que las Inmunoglobulinas (Ig), son producidas e

inmersas en círculo por las células plasmáticas.

La producción de CLL (κ + λ), es decir de Cadenas Ligeras no incorporadas en las Inmunoglobulinas completas, es de alrededor de 170 mg/24h y constituye el 10-20% de la producción diaria de Cadenas Ligeras (CL) (1).

El catabolismo de las CLL se efectúa casi enteramente en el riñón.

La concentración de CLL en la sangre del sujeto normal es muy baja (2 mg/dl) (1) incluso siendo relevante la cantidad inmersa en círculo puesto que, por su bajo peso molecular (22.000 para el monómero), pasan rápidamente al Filtrado Glomerular (FG); es igualmente baja la concentración en orina (5 mg/24h) (1) dado que las CLL presentes en el FG son reabsorbidas y catabolizadas por el Túbulo Proximal.

Desde el punto de vista renal el comportamiento de las CLL es análogo al de las demás Microglobulinas: β 2-micro, α 1-micro, etc. (1).

En el sujeto con Filtrado Glomerular normal, la hemivida de las CLL se valora entre 30 y 60 minutos (1), si se excluye su estacionamiento en la vejiga.

Las CLL en la orina expresan el balance entre la síntesis de las Células-B y el catabolismo renal (filtración glomerular y reabsorción tubular) en el período entre la última micción y la actual, o en el período de recogida (2).

El aumento de la concentración de CLL en la orina tal como para poderlo evidenciar con los métodos de rutina del laboratorio puede estar determinado por:

- aumento de la producción de CLL, que determina el aumento de su concentración en el Filtrado Glomerular y la superación de la capacidad actual específica de la reabsorción tubular.
- reducción de la capacidad actual específica de reabsorción tubular.
- simultaneidad de las dos situaciones anteriores.

Las CLL en la orina seran policlonales (CLLP), monoclonales (CLLM - Proteínas de Bence Jones - BJP), o las dos contemporaneamente según la cualidad de la producción de las Células-B.

Algunas técnicas electroforéticas caracterizadas por su alta resolución y sensibilidad muestran las CLLP distribuidas, en lugar de en la tradicional mancha difusa, en bandas estrechas y homogéneas, desde 3 hasta 7, organizadas según un esquema característico denominado "ladders" (escalera de peldaños) (3).

Este fenómeno no tiene por ahora una explicación segura (4) pero realmente crea algunos problemas en la interpretación diferencial entre CLLP y BJP, empeorados por la posibilidad de superposición de ambas situaciones (3).

En la práctica de laboratorio la presencia de las CLL asume distinto valor según si se trata de BJP o de CLLP, mientras que merece una consideración aparte en el ámbito de los protocolos precontrastográficos.

PROTEINAS DE BENCE JONES (BJP)

Las Proteínas de Bence Jones (BJP), es decir las CLLM presentes en la orina en el curso de enfermedades linfoproliferativas, debido al aumento de producción de las células plasmáticas de un clon, que provoca y a la que se une la nefropatía tubular secundaria a la sobrecarga, son históricamente el primer marcador tumoral identificado y, después de más de 140 años desde la genial intuición de Henry Bence Jones (5,6), conservan intacto su valor de signo diagnóstico, en ocasiones único, precoz y de hallazgo accidental e inesperado; no sólo esto, sino que han adquirido valor en el diagnóstico diferencial, en la prognosis y en el seguimiento de la evolución de la enfermedad.

Las BJP están presentes en el 60-80% de los pacientes con Mieloma Múltiple y, en el 15-20% de los Mielomas son el único producto excretado por el clon maligno (Mieloma Micromolecular).

BJP se encuentran en el curso de muchas otras neoplasias de las Células-B: Macroglobulinemia de Waldenström, Leucemia Linfática Crónica, Enfermedad de Cadenas Pesadas y otras neoplasias linfoproliferativas.

Las BJP, causa de la enfermedad, están presentes en una elevada porcentual de pacientes con Amiloidosis AL y, más raramente, en pacientes con Enfermedad de Depósito de Cadenas Ligeras.

Pequeñas cantidades de BJP se encuentran en la orina de pacientes con Componente Monoclonal en el suero no asociada a enfermedad (MGUS).

Por otra parte, cantidades incluso importantes de BJP pueden estar presentes en pacientes que no presentan ninguna enfermedad sistemática: Proteinuria de Bence Jones Idiopática (7), incluso aunque casi siempre en estos casos el seguimiento a largo plazo ha evidenciado la evolución en Mieloma Múltiple o Amiloidosis (8).

Así pues, con raras excepciones, las BJP no sólo indican un proceso maligno, sino que son en sí mismas una "entidad maligna" (el Mieloma Micromolecul ar no es por sí mismo "más maligno" que otros mielomas) que produce efectos patológicos principalmente en el riñón (9).

CADENAS LIGERAS LIBRES POLICLONALES

Un exceso de CLLP en orina puede ser consecuencia de un aumento de la producción policlonal o de una alteración de la función tubular.

Aumento de la producción policlonal

El exceso de CLLP en orina es frecuente en las enfermedades inflamatorias agudas y crónicas como la Sarcoidosis, la Tuberculosis Pulmonar, el Lupus Erythematosus, la Artritis Reumatoide, etc.

Alteración de la Función Tubular

Las CLL policlonales (CLLP) en orina son un índice sensible, al igual que las demás microglobulinas, de insuficiencia en la reabsorción tubular específica.

Su hallazgo en el paciente diabético, tanto adulto (10) como niño (11), parece ser un signo predictivo de nefropatía, incluso en ausencia de Albuminuria.

La insuficiencia tubular y la consiguiente presencia de CLLP en orina puede ser transitoria, ligada, por ejemplo, a carga en aminoácidos tipo lisina o arginina, o a la toma de fármacos (p.ej. antibióticos).

CONTRAINDICACIONES AL USO DE MEDIOS DE CONTRASTE

Consideración aparte merece la búsqueda de las BJP en el ámbito de las contraindicaciones al uso de medios de contraste organo-iodados inyectados (y también por vía oral (12)).

Para el surgimiento de la Insuficiencia Renal Aguda, el nexo original entre Mieloma y Medio de Contraste (13,14) se ha ido substituyendo por el nexo entre BJP, otras causas concurrentes y Medio de Contraste (12,15,16).

Los medios de contraste "no iónicos" y aquellos con "baja osmolaridad" parecen menos nefrotóxicos respecto a los clásicos de "alta osmolaridad" en sujetos con alteración de la función renal, mientras que en el sujeto normal no habrían diferencias remarcables (17,18).

Por lo tanto la relación coste/beneficio no parece por el momento justificar el uso indiscriminado de medios "no iónicos" y de "baja osmolaridad", más costosos que los tradicionales de "alta osmolaridad" (19,20).

Aunque teóricamente pueda ser una hipótesis el que en pacientes con BJP el uso de medios de contraste "no iónicos" pueda reducir el riesgo de Insuficiencia Renal, no hay, por ahora, datos clínicos que la soporten (16).

En la búsqueda precontrastográfica, además del objetivo específico, sucede de hecho que se encuentran tanto BJP como CLLP, lo que ha estimulado una mayor atención por las CLL, en la que cabría incluir este estudio.

A la importancia, arriba sintetizada, de la búsqueda de las BJP y las CLL no parece, por el momento, corresponder una adecuada estandarización de métodos, protocolos, referencias, controles y de la expresión del informe, todas ellas exigencias insistentes y justamente señaladas por los operadores.

El grupo de estudio se ha puesto por ello el objetivo de verificar la posibilidad de uniformizar tales elementos.

Sería por lo menos deseable que una muestra resultase "BJP-positiva" o "BJP-negativa" en todos los Laboratorios.

La estrategia adoptada es la de la comparación de las experiencias operativas de la rutina cotidiana de cada laboratorio, que reflejan sus distintas y múltiples realidades dimensionales, estructurales y organizativas.

Los primeros resultados, si por una parte han confirmado la multiplicidad de enfoques,

por otra han evidenciado algunas consecuencias inesperadas, que por ello estimamos oportuno divulgar inmediatamente, y contemporaneamente nos llevan a insistir en la estrategia que hemos tomado con el fin de definir, para la valoración de las BJP y de las CLL, al menos las "características reales" de los métodos que pueden usarse en la práctica, para luego pasar a definir el "tipo de muestra" y llegar finalmente a uniformizar la "expresión del informe" en su conjunto.

OBJETIVO Y PROCEDIMIENTO

Los estudios sobre las CLL están actualmente dirigidos a la búsqueda de las BJP, mientras que las CLLP son consideradas un hallazgo accesorio, a menos que no se pretenda buscarlas expresamente como índice de proteinuria tubular, en cuyo caso parece el método de elección la determinación cuantitativa directa con la Inmunoprecipitación en fase Líquida (IPL), turbidimetría o nefelometría, efectuada con Reactivos específicos para las CLL.

Para la búsqueda de las BJP es fundamental que una muestra resulte "positiva" o "negativa" en todos los laboratorios prescindiendo del método o del protocolo, es decir del conjunto de métodos de Screening y profundización, empleado.

Para tal fin es necesario valorar lo siguiente:

Resulta un objetivo principal la valoración de la "sensibilidad" y la "precisión" de los métodos particulares para poder colocarlos dentro de la estrategia de búsqueda de las BJP.

La valoración de la "precisión" no es sólo previa a la posibilidad de una eventual determinación cuantitativa sino que es indispensable para la correcta valoración de la "sensibilidad".

Para una primera verificación hemos utilizado el modelo elemental, pero lineal, constituido por diluciones escalares de una muestra con una importante BJP y sólo trazas de otras proteínas; ello permite valorar y confrontar la "sensibilidad y precisión" de los métodos al determinar la "anormalidad de la muestra", prescindiendo de cualquier consideración sobre la concentración absoluta de las BJP.

Este enfoque ha parecido un indispensable punto de partida, aún no siendo exhaustivo, a causa de la heterogeneidad de las BJP y las CLL:

- Las BJP son entre ellas antigénicamente distintas, incluso en el ámbito del mismo tipo, y esto puede determinar variaciones de respuesta en las técnicas de Inmunoprecipitación en Fase Líquida (IPL) (Nefelometría, Turbidimetría) y en la Inmunofijación (IFE), mientras no influencia a la Electroforesis (EF).
- Las CLLP serán evidenciadas con menor sensibilidad por la EF y por la IFE respecto a una misma cantidad de BJP puesto que, por la distribución sobre una superficie más amplia respecto a la banda estrecha típica de las BJP, las CLLP tendrán una concentración por unidad de superficie más baja; Figura: 1 (21).

A la heterogeneidad del "valor del estudio" se añade pues la heterogeneidad de las CLL "objeto del estudio".

Figura 1

De monoclonal a policlonal - Simulación por Ordenador (9).

Efecto de la misma cantidad de color distribuida sobre una cierta superficie asimilable a la banda homogénea de las BJP y escalarmente hasta una superficie 8 veces mayor asimilable a CLL policlonales.

Se demuestra que, para la misma concentración de proteínas, la sensibilidad de la EF y de la IFE decrece proporcionalmente al aumento de la superficie sobre la que las proteínas se distribuyen; en el caso de las CLL, desde la banda monoclonal de las BJP al aspecto difuso de las CLL policlonales.

Figura 2

Electroforesis de la Muestra "Bellaria": Diluciones: 1:20, 1:40, 1:60, 1:100, 1:150, 1:200. Kit Agarosa "Silenus" (NSC); colorante Violeta.

Muestras

El Laboratorio del Hospital Bellaria de Bolonia ha seleccionado una muestra de orina de un paciente afectado por Mieloma Mielomocromoleculare con importante BJP tipo lambda y sólo trazas de otras proteínas; muestra denominada "Bellaria".

Los Laboratorios han recibido seis diluciones de la muestra efectuadas con PBS (1:10,

1: 20, 1: 40, 1: 60, 1: 80, 1: 100).

La Figura 2 muestra la EF de las diluciones 1:20, 1:40, 1:60, 1:100, 1:150 y 1:200.

Cada Laboratorio partiendo de la dilución 1:10 ha preparado, en Solución Fisiológica, las siguientes diluciones sucesivas: 1:150, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:600, 1:800, 1:1000.

Procedimiento Operativo

Todas las diluciones han sido analizadas con los métodos tanto de Screening como de profundización usados en rutina para la búsqueda de las BJP.

Para los métodos cuantitativos una primera valoración de la "precisión" en la serie y entre series ha sido obtenida efectuando la determinación dos días distintos, dos veces cada día.

Material y Métodos

Las Tablas de la I a la IV esquematizan los materiales y métodos empleados.

En general los procedimientos operativos son los sugeridos por el productor.

Por lo que respecta a las Proteínas Totales (PT), ya en una evaluación precedente surgió una notable variabilidad entre Laboratorios. Se pensó por ello en experimentar, junto al método normalmente usado en la rutina por cada Laboratorio, un kit común a todos.

La Empresa Sentinel aceptó la invitación a suministrar su kit "Rojo Pirogarol + SDS" que ha sido usado según las instrucciones adjuntas al producto, sin el soporte técnico del proveedor.

RESULTADOS Y COMENTARIOS

Las Tablas V, VI, VII, VIII muestran una extrema síntesis de los resultados conjuntos obtenidos, los cuales comentamos brevemente a continuación.

Tabla I

Métodos/Laboratorios - Proteínas Totales
Leyenda: P.L. - Preparado en el Laboratorio

Tabla II

Métodos/Laboratorios - Electroforesis
Leyenda: Orina no Conc. - Kit y Método recomendado para orinas no concentradas
Nota: La tabla relaciona los proveedores actuales de los productos usados

Tabla III A

Métodos/Laboratorios - IFE/IEP
Leyenda: Orina no Conc. - Kit y Método recomendado para orinas no concentradas
Nota: La tabla relaciona los proveedores actuales de los productos usados

Tabla III B

Métodos/Proveedores - IFE/IEP
Leyenda: Orina no Conc. - Kit y Método recomendado para orinas no concentradas
Nota: La tabla relaciona los proveedores actuales de los productos usados

Tabla IV A

Métodos/Laboratorios - Inmunonefelometría
Leyenda: CLL/S - Cadenas Ligeras Libres - reactivos Separados
CLL/M - Cadenas Ligeras Libres - reactivo Mixto
CLT - Cadenas Ligeras Totales - Libres & Ligadas (Ig-Ligeras)

NSC - New Scientific Company
BNA - Nefelómetro Behring "BNA" y similares
APS - Nefelómetro Beckman "APS" y similares
QM300 - Nefelómetro Kallestad "QM300" y similares

Tabla IV B

Métodos/Proveedores - Inmunonefelometría

Tabla V

Proteínas Totales en Dilución 1:10 - Concentración en mg/dl

Nota: Los valores son la media de los resultados

Tabla VI

Límite Sensibilidad - Máxima Dilución

Leyenda: CLL - Cadenas Ligeras Libres

CLT - Cadenas Ligeras Totales - Libres & Ligadas (Ig-ligeras)

Agarosa Normal - Kit y Método recomendado para suero y orinas concentradas

Agarosa Orina - Kit y Método recomendado para orinas no concentradas

Notas: >XXX - Última dilución efectuada

(*) - Muestra Concentrada 50 veces

Tabla VII

Límite Sensibilidad - Mínima Concentración Positiva (Entera: 250-450 mg/dl)

Leyenda: CLL - Cadenas Ligeras Libres

CLT - Cadenas Ligeras Totales - Libres & Ligadas (Ig-ligeras)

Agarosa Normal - Kit y Método recomendado para suero y orinas concentradas

Agarosa Orina - Kit y Método recomendado para orinas no concentradas

Notas: <XXX - Última dilución efectuada

(*) - Muestra Concentrada 50 veces

Tabla VIII

Valoración de la Dilución 1:100 (2.5-4.5 mg/dl)

Leyenda: CLL - Cadenas Ligeras Libres

CLT - Cadenas Ligeras Totales - Libres & Ligadas (Ig-ligeras)

Agarosa Normal - Kit y Método recomendado para suero y orinas concentradas

Agarosa Orina - Kit y Método recomendado para orinas no concentradas

Notas: Los valores cuantitativos son la media de los resultados

(*) - Muestra Concentrada 50 veces

Estabilidad de las Diluciones Distribuidas

El intervalo entre la preparación de las diluciones distribuidas y la ejecución de los test en los laboratorios ha sido muy variable.

La estabilidad de las diluciones distribuidas ha sido por ello controlada determinando las CLL-lambda con método inmunoturbidimétrico manual con reactivo específico anti CLL-lambda.

La Figura 3 ilustra los resultados obtenidos.

Se puede aceptar como conclusión que no han habido variaciones apreciables dentro del período de observación: desde diciembre 1993 hasta abril 1994.

Figura 3

Estabilidad en el tiempo de las diluciones.

Determinación Inmunoturbidimétrica de las Cadenas Ligeras Libres con reactivo específico para las CLL.

Los símbolos identifican las fechas de las determinaciones.

Concentración Presumible de BJP-Lambda

Del conjunto de los resultados de los métodos cuantitativos (y de la "experiencia" de los Operadores para los métodos cualitativos) se puede razonablemente asignar a la Muestra "Bellaria" una concentración de BJP-Lambda comprendida entre 250 y 450 mg/dl (2.5-4.5 g/L); ciertamente el intervalo es amplio pero es de todos modos útil como punto de referencia.

Resultado Positivo

Ha sido considerado "resultado positivo" el "signo de anormalidad" típico de cada método:

- Electroforesis: banda estrecha
- Inmuno-electroforesis: arco anómalo, constituido por CL
- Inmunofijación con antisueros anti CLT: banda estrecha constituida por CL
- Inmunofijación con antisueros anti CLL: banda estrecha constituida por CLL
- Proteínas Totales: presencia medible de Proteínas
- Inmunonefelerimetría con reactivos anti CLT: presencia medible de CL
- Inmunonefelerimetría con reactivos anti CLL: presencia medible de CLL

Proteínas Totales

La Tabla V relaciona los resultados obtenidos sobre la dilución 1:10; las demás diluciones han dado resultado negativo o resultados no fiables por CV elevados y/o señales demasiado bajas.

Más allá de cualquier valoración sobre las características de cada método en particular que no es el objetivo de este trabajo, resulta evidente la no homogeneidad de los resultados que padece una determinación pretendidamente "cuantitativa".

Por lo que respecta al kit Sentinel subrayar que la no homogeneidad de los resultados es similar a la obtenida con los demás kits; con el atenuante de que los participantes experimentaban el kit por primera vez y sin el soporte y la asistencia del proveedor.

En términos de "sensibilidad" ninguno de los métodos usados ha demostrado suficiente robustez en las diluciones superiores a 1:40 (6.25-11.25 mg/dl).

Se puede discutir acerca de las particulares características de la muestra en examen por una parte y por otra sobre el hecho de que los Calibradores empleados son distintos entre ellos.

De aquí el propósito de repetir la experimentación usando todos el mismo Calibrador.

Las consideraciones antes relacionadas han llevado a no incluir los resultados de las PT en las tablas "Límite de Sensibilidad" y "Valoración Dilución 1:100".

Sensibilidad - Dilución/Concentración Límite

La Tabla VI relaciona la última dilución que ha dado "resultado positivo" y la Tabla VII la correspondiente concentración de BJP-Lambda calculada en base al presunto valor antes definido (250-450 mg/dl).

Como ya se ha indicado, la tabla no relaciona la determinación de las PT.

Los datos más importantes son:

A) Nefelometría

Los métodos inmunonefelerimétricos realizados tanto con Reactivo para las CLT como con Reactivo para las CLL demuestran ambos una óptima sensibilidad, ligeramente superior para el Reactivo CLL.

El CV en la serie y entre series ha sido, en el ámbito de medida de los métodos, siempre inferior al 10%.

El "paralelismo" entre el Calibrador y la Muestra ha resultado, en el caso específico, satisfactorio.

B) Electroforesis en Acetato de Celulosa - Coloración Rojo Ponceau y Azul Coomassie

Aparentemente la sensibilidad es más bien baja con ambos colorantes, mejor para el Coomassie, pero, si se considera que en rutina la muestra se concentra de 25 a 100 veces, la sensibilidad, incluso con el Rojo Ponceau, es más que satisfactoria (ver Malpighi).

C) Electroforesis en Agarosa - Kit para Orinas no Concentradas

Estos kits han sido usados en tres laboratorios (Pesaro, Piacenza y Rimini) y la sensibilidad ha resultado claramente satisfactoria.

Sería sin duda interesante una experimentación más extensa y de mayor profundidad.

D) Electroforesis en Agarosa, Colorante Coomassie - Todo "Preparado en Casa"

Ha sido efectuada en Pordenone; la sensibilidad es muy buena especialmente si se considera que en la rutina las Muestras son concentradas.

E) Electroforesis en Acetato y Agarosa - Coloración con Oro Coloidal

La sensibilidad del Oro, al menos con los kits comerciales usados, es, en Acetato de Celulosa, muy poco superior, y con Agarosa, claramente inferior respecto a la obtenida con el Coomassie.

Puesto que la coloración con Oro es empleada para evitar la concentración de la Muestra se deduce que la sensibilidad de este método ha resultado claramente (e inesperadamente) modesta.

Esto contrasta con lo relacionado en la bibliografía incluso reciente (22,23) donde se detalla para el Oro Coloidal en Acetato una sensibilidad de alrededor de 6 mg/l (0.6 mg/dl) en términos absolutos, y en cualquier caso, respecto al Coomassie que llegaría a 75 mg/l (7.5 mg/dl), la sensibilidad del Oro sería mejor en más de 10 veces.

Una posible hipótesis es que el uso de los reactivos preconfeccionados de los kits empleados provoque esta diferencia respecto a los resultados de la bibliografía.

F) Inmunofijación en Agarosa - Kit y Método para suero y orinas concentradas

La sensibilidad ha resultado buena en todos los laboratorios especialmente si se considera que en la rutina las Muestras se concentran.

A señalar que, al menos para la Muestra en examen, la sensibilidad es equivalente con los antisueros específicos anti CLL y con los antisueros anti CLT.

G) Inmunofijación en Agarosa - Kit y Método para orinas no concentradas

La sensibilidad ha resultado buena en todos los Laboratorios y es equivalente tanto con los antisueros anti CLT como con aquellos específicos anti CLL.

H) Inmunolectroforesis en Agarosa

Ha sido efectuada en Piacenza y "la vieja" por sensibilidad demuestra tener poco que enviar a la IFE.

Valoración Dilución 1:100

La Tabla VIII evidencia cual sería el resultado de los distintos métodos sobre una Muestra conteniendo una BJP-lambda idéntica a la de la Muestra "Bellaria" pero 100 veces inferior.

Una BJP tal sería ciertamente digna de señalar puesto que es ya evidente en la EF de la muestra no concentrada (Figura 1) y con una concentración estimable entre 2.5 y 4.5 mg/dl (25-45 mg/L).

Los métodos para las Proteínas Totales y la EF coloreada con Oro presentan una sensibilidad insuficiente.

Todos los demás métodos presentan una sensibilidad satisfactoria, por un buen margen, si se considera que aquellos que prevén la concentración de la muestra habrían dado "resultado positivo" como se demuestra por lo obtenido en Malpighi en la dilución 1:100 concentrada 50 veces con la EF de rutina coloreada con Rojo Ponceau.

Conclusiones

Los resultados indican la necesidad de continuar en la estrategia de la valoración y de la comparación multicéntrica para alcanzar, en la búsqueda de las BJP y de las CLL, una calidad suficiente y homogénea incluso en la diversidad de ambientes y enfoques.

Con tal fin parece necesario disponer de "Muestras de Control" que, aunque sean "imperfectas", resulten suficientes para valorar e uniformizar, al menos en términos de "positivo/negativo", la sensibilidad y la precisión de los métodos utilizables en la práctica rutinaria.

Se deberá posteriormente definir el "tipo de muestra", con el objetivo final de conseguir uniformizar la "Expresión del Informe" en su conjunto.