

Gruppo di Studio Inter-Regionale "Forlì" su "Proteine di Bence Jones e Catene Leggere Libere"

Segreteria Scientifica: Gualtiero Pallotti, Ospedale Pierantoni, Forlì

Organizzazione e Coordinamento: Leonardo Massaro e Rita Scaringi

New Scientific Company S.r.l., Via Dante 35, 20032 Cormano, (MI).

Raccomandazioni per la Valutazione della Proteinuria di Bence Jones

Forlì, 16 Giugno, 2000 - **Bozza**

Partecipanti

Partecipanti ai lavori del meeting del 16 Giugno 2000

Ospedale Civile	Asola	Scipiotti C
Ospedale di Bentivoglio	Bentivoglio (BO)	Milanesi MG, Turra F
Ospedale Bellaria	Bologna	Martelli M, Zannini R
Ospedale Maggiore	Bologna	Cucci A
Ospedale Civile	Bra (CN)	Testa G, Valle S
Spedali Civili - Lab. Immunologia	Brescia	Quinzanini M
Ospedale di Faenza	Faenza	Gollini C
Ospedale Santa Croce	Fano	Sadori R
Ospedale Careggi	Florence	Piazza E
Ospedale Pierantoni	Forlì	Mambelli C, Pezzi L
Ospedale Civile	Fossombrone (PS)	Del Prete E
Ospedale Policlinico	Modena	Tizzanini W, Guidetti F
Ospedale Civile	Monselice (PD)	Mingardo S
Ospedale Destra Secchia	Pieve Coriano (MN)	Tirelli F, Zanni R
Ospedale San Salvatore	Pesaro	Acetoso M
Ospedale Civile	Piacenza	Croci E
Ospedale del Ceppo	Pistoia	Valenti D, Lucherini M
Ospedale Santa Maria degli Angeli	Pordenone	Ferrai MG
Ospedale Santa Maria delle Croci	Ravenna	Gardini G
Ospedale Infermi	Rimini	Argento A, Conti C
Ospedale Civile	Viterbo	Muratore MT

Introduzione

La ricerca delle Proteine di Bence Jones (BJP) dovrebbe essere ritenuta elemento importante nella diagnosi, prognosi e follow-up delle discrasie plasmacellulari come meglio indicato nel paragrafo "Indicazioni per la ricerca della BJP" e in Figura 2.

Definizioni e Sinonimi

Sinonimo: Proteine di Bence Jones = Catene Leggere Libere Monoclonali in urine.

Definizione: Catene Leggere Libere Monoclonali in urine; le BJP all'elettroforesi migrano in banda stretta costituita da Catene Leggere Libere. Possono essere presenti più bande di BJP.

(Eccezionalmente la BJP può presentarsi in forma di banda larga che però reagisce come detto sotto.)

In ogni caso tale banda reagisce esclusivamente con un solo tipo di antisiero anti Catena Leggera Libera, kappa o lambda, o, esclusivamente con un solo tipo di antisiero anti Catene Leggere Libere & Legate (Antisiero anti Catene Leggere Totali - CLT) e non reagisce con nessuno degli antisieri anti Catena Pesante.

Altre situazioni o definizioni che interessano le Catene Leggere Libere in urine sono, a seconda della tecnica elettroforetica utilizzata:

a) Catene Leggere Libere policlonali (CLLP)

Banda elettroforetica larga che reagisce con entrambi i tipi di antisieri anti CLL, sia kappa sia lambda. Le CLLP possono coesistere con le BJP.

- b) Catene Leggere Libere policlonali a bande multiple o Ladders
Molteplici bande elettroforetiche strette che assumono un pattern caratteristico e che reagiscono con entrambi i tipi di antisieri anti CLL. Hanno significato analogo alle CLL Policlonali. Possono coesistere con una BJP.

Indicazioni per la ricerca della BJP

La ricerca della Proteina di Bence Jones dovrebbe essere richiesta ed eseguita in tutte le situazioni sotto elencate:

- Protocollo operativo di approfondimento diagnostico nel caso di:
 - sospetto clinico di malattia immunoproliferativa come:
Macroglobulinemia di Waldenström, Mieloma Multiplo, Leucemia Linfatica Cronica, Amiloidosi Primitiva, ecc.
 - elettroforesi serica che evidenzi una nuova banda monoclonale.
 - dati di laboratorio che inducano il sospetto di mieloma micromolecolare.
- Protocollo operativo di controllo dell'evoluzione in caso di:
 - malattia immunoproliferativa.
 - Paziente con banda monoclonale serica ma senza diagnosi di malattia immunoproliferativa
 - Paziente con BJP (in urine) ma senza diagnosi di malattia.
- Protocollo delle indagini di esclusione del Mieloma Multiplo
Per escludere che il paziente sia affetto da "mieloma multiplo" non è sufficiente eseguire l'elettroforesi delle sieroproteine ma è necessario eseguire la ricerca delle Proteine di Bence Jones.
Infatti in caso di "mieloma micromolecolare" frequentemente l'elettroforesi del siero non presenta significative e specifiche alterazioni.

Si veda anche Figura 2.

Indicazioni per la valutazione quantitativa delle BJP

Si dovrebbe eseguire la valutazione quantitativa della BJP al fine di evidenziarne le variazioni quantitative (di livello) sia nel caso di malattia conclamata e suo trattamento sia nel caso di BJP e/o di CM nel siero non associate a malattia.

Nello stabilire la periodicità dei controlli e il significato delle variazioni quantitative della BJP si dovrebbe tenere conto dell'emivita molto breve delle Catene Leggere Libere.

Tipo di campione

La ricerca delle BJP dovrebbe essere eseguita su un campione di raccolta di urine di 24 ore con aggiunta di conservante SodioAzide o, in alternativa, campione di urina estemporanea su cui dovrebbe essere eseguito anche il dosaggio della creatinina.

Il tipo di campione dovrebbe essere esplicitato nel referto.

Metodi di ricerca della BJP

Il metodo o il protocollo, cioè l'insieme di più metodi, per la ricerca delle BJP dovrebbe consentire la valutazione dei due elementi che la caratterizzano: a) banda elettroforeticamente omogenea, b) costituita da un solo tipo di Catene Leggere Libere. In altre parole i metodi o protocolli dovrebbero essere in grado di precisare le due caratteristiche:

- Specificità antigenica: Catene Leggere Libere - dovrebbe essere valutata con metodo immunochimico.
- Mobilità elettroforetica: banda omogenea - dovrebbe essere valutata con metodo elettroforetico.

Come per qualsiasi analita anche per la BJP si dovrebbe, nella scelta del metodo, porre attenzione alla specificità, sensibilità, campione-dipendenza della sensibilità, inaccuratezza intra e inter laboratorio, campione dipendenza della inaccuratezza; si dovrebbe disporre di procedure e campioni di controllo dei parametri suddetti.

In generale, i metodi disponibili in routine per la ricerca delle BJP sono:

1. ImmunoFissazione (IFE)

Pur essendo generalmente considerata un metodo unico, è in realtà un protocollo costituito da due fasi: prima fase è l'elettroforesi, seconda fase è l'ImmunoPrecipitazione.

La IFE è un metodo qualitativo e non fornisce informazioni quantitative.

La IFE per la ricerca delle BJP dovrebbe eseguirsi sia con antisieri anti Catene Leggere Libere & Legate (antisieri anti Catene Leggere Totali) (CLT) sia con antisieri anti Catene Leggere Libere (CLL). Comunque, per evitare falsi negativi, gli antisieri anti CLL dovrebbero essere sempre utilizzati nel caso il campione risulti negativo per la BJP usando gli antisieri anti Catena Pesante e anti CLT. Vedi Figura 1.

La IFE dovrebbe avere, con tutti gli antisieri, sensibilità almeno sufficiente ad evidenziare una banda costituita da 1 mg/dl di BJP. In caso contrario il campione dovrebbe essere opportunamente concentrato per raggiungere la sensibilità finale suddetta.

Nella valutazione del risultato e della sensibilità si dovrebbe porre attenzione alla presenza di più bande di BJP, di FLC policlonali, di Immunoglobuline policlonali

2. **Elettroforesi (EF)**

Per la ricerca delle BJP la EF dovrebbe essere considerata:

□ Metodo di screening nel primo accertamento.

Tutti i campioni che mostrano all'EF una banda omogenea – tipo transferrina, o diffusa – tipo Ig, che non sia certamente attribuibile all'Albumina dovrebbero essere riesaminati con la IFE. In ogni caso l'Elettroforesi dovrebbe avere sensibilità tale da evidenziare 1 mg di BJP. In caso contrario il campione dovrebbe essere opportunamente concentrato.

□ Metodo quantitativo nel primo accertamento e nei controlli successivi.

Si procede misurando le Proteine Totali (PT) del campione e eseguendo la densitometria del tracciato elettroforetico. In questo caso bisognerebbe comunque tenere presenti i seguenti accorgimenti:

- La sensibilità della determinazione quantitativa delle PT dovrebbe essere in grado di rilevare quantità di BJP di 1 mg/dl. In caso contrario si dovrebbe utilizzare il campione opportunamente concentrato e il volume del concentrato deve essere tale da consentire la determinazione. Si dovrebbe valutare l'imprecisione e l'inaccuratezza del sistema di concentrazione.
- L'EF dovrebbe essere eseguita con coloranti compatibili con la lettura densitometrica, e i coloranti dovrebbero reagire con buona proporzionalità con le BJP e le altre proteine.
- La sensibilità dovrebbe essere tale da consentire la rilevazione di una banda di BJP di 1 mg/dl. In caso contrario si dovrebbe utilizzare il campione concentrato e si dovrebbe valutare l'imprecisione del sistema di concentrazione.

3. **Determinazione diretta delle Catene Leggere Libere** con ImmunoPrecipitazione in fase liquida, Nefelometrica e Turbidimetrica, con reagenti specifici anti CLL

Per la ricerca della BJP, dovrebbe essere considerata:

□ Metodo di screening nel primo accertamento. Tutti i campioni con una delle due Catene Leggere > 0.5 o 1 mg/dl dovrebbero essere riesaminati con la IFE o con la EF.

□ Metodo quantitativo nel primo accertamento e nei controlli successivi. In questo caso si dovrebbero tenere in considerazione i seguenti elementi:

- Possibile presenza contemporanea di CLL policlonali
- Possibile mancanza di parallelismo tra calibratore e campione monoclonale. Per minimizzare questo fenomeno si dovrebbe diluire il campione fino ad avere una concentrazione tra 1 e 3 mg/dl e quindi moltiplicare per la diluizione effettuata.

Metodi per valutare le variazioni quantitative della BJP

Nella valutazione quantitativa della BJP ci si dovrebbe rapportare alla diuresi o alla creatinina urinaria.

Altre determinazioni correlate

Sia nel primo accertamento sia nei controlli successivi sarebbe opportuno determinare le Immunoglobuline e le Catene Leggere Totali seriche. Utile il dosaggio dell'alfa-1 microglobulina.

Referto

Per una migliore paragonabilità dei risultati della ricerca della BJP si dovrebbero esplicitare nel referto tutte le informazioni utili. Di seguito è la proposta di uno schema:

Schema di referto

La Commissione Liguria ha proposto la bozza di schema di referto riportata di seguito:

Nome del Test: Ricerca della Proteina di Bence Jones

Test di screening:

Campione: urina estemporanea (o altro da precisare)

Metodo sensibilità mg/dl)

Risultato Negativo

Necessità di test di conferma

Test di conferma:

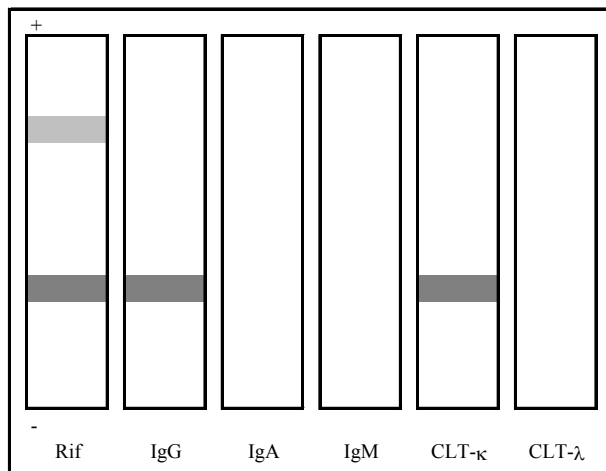
Campione: urina estemporanea (o altro da precisare)

Metodo sensibilità mg/dl)

Tempo di attesa per risultato definitivo:

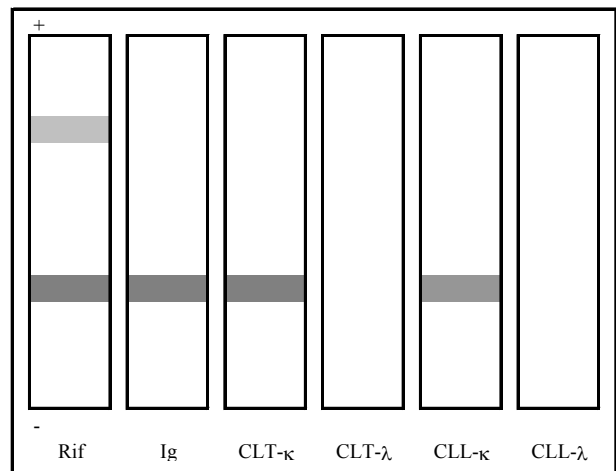
Risultato:

Figura 1 IFE urine – Campione con Componente Monoclonale (CM) IgG-kappa + CM kappa libere (BJP kappa)



IFE "tipo siero" con Antisieri anti Catene Leggere libere & legate (Catene Leggere Totali - CLT), senza Antisieri anti Catene Leggere Libere (CLL).

Conclusioni CM IgG-kappa - **BJP assente**



IFE con Antisiero anti Ig (polivalente Catene Pesanti) e antisieri anti Catene Leggere Totali (CLT) e Catene Leggere Libere (CLL)

Conclusioni CM IgG-kappa + **BJP-kappa**

La BJP presente nel campione co-migra con la IgG intatta e quindi è possibile evidenziarla solo con l'uso degli Antisieri anti Catene Leggere Libere.

Figure: 2 Free Light Chains and Associated Pathology (from the literature)

Pathology

Bence Jones Proteins (BJP)

- Multiple Myeloma (15%-20% being Micromolecular Myeloma)
- Waldenström's Macroglobulinemia
- Chronic Lymphocytic Leukaemia
- Heavy Chain μ Disease
- Other Lymphoproliferative Neoplasia

- AL Amyloidosis
- Light Chain Deposition Disease (LCDD)

- Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS)
- Idiopathic Bence Jones Proteinuria



The BJP do not only indicate a malignancy process but are they themselves a "malignant entity" (micromolecular myeloma is not in itself "more malignant" than other myeloma) which produces pathological effects, above all on the kidneys.

Polyclonal Free Light Chains

- ◆ Increase in the Polyclonal Production
Sarcoidosis, Pulmonary Tuberculosis, Lupus Erythematosus, Rheumatoid Arthritis
- ◆ Alteration in Tubular Function
Fanconi Syndrome, Diabetic Nephropathy, amino acids load such as lysine or arginine, assumption of medication