

**Commissione congiunta SiBioC – AIPAC – SIMEL, Sezioni Liguri, su
"Proteine di Bence Jones e Catene Leggere Libere"
Genova, 22 giugno 2000**

Stesura a cura di Liliana Burlando

L'esperienza ormai triennale della multicentrica BJP condotta insieme alla commissione Forlì consente oggi di sottolineare come acquisiti alcuni elementi.

C'è intanto da rimarcare che si tratta del, crediamo, unico tentativo, precedentemente iniziato dalla Commissione Forlì, di valutazione, attraverso l'invio di uno stesso set di campioni in vari laboratori, delle metodiche commerciali in uso per la ricerca della Proteina di Bence Jones.

Obiettivo primo era stato per noi la verifica di SENSIBILITÀ e RIPRODUCIBILITÀ dei metodi di SCREENING e di CONFERMA in uso in Liguria anche ai fini di una possibile ed auspicabile uniformità di risposta e di refertazione.

Al riguardo, in sintesi, abbiamo constatato quanto segue:

A. TEST DI SCREENING

A.1 NEFELOMETRIA – TURBIDIMETRIA (su BNA-BNII Behring, APS e IMAGE Beckman, Cobas Roche)

A.1.a *Con antisieri anti catene leggere totali:*

- Riproducibilità molto buona per tutti
- Sensibilità molto buona per i sistemi Behring (fino a 0.7 mg/dl per kappa e 0.4 mg/dl per lambda, meno buona per i sistemi Beckman a causa del limite posto dalla stessa casa produttrice a 0.55 mg/dl per le kappa e 1.5 mg/dl per le lambda).
- Espressione del risultato: Behring e Beckman differiscono per un fattore 3.33.

È assolutamente necessario uniformare.

A.1.b *Con antisieri anti catene leggere libere NSC:*

- Buona riproducibilità e buona sensibilità (migliore di 0.5 mg/dl sia per kappa che per lambda) con tutti gli strumenti.

A.2 ALTRI METODI IMMUNOMETRICI (Turbidimetria manuale CLT Medic e CLL Chemical Diagnostic, RID CLL Bioline)

- Sensibilità insufficiente
- Riproducibilità non verificata dato lo scarso numero di determinazioni.

A.3 SISTEMI ELETTROFORETICI

Descrivere sinteticamente i risultati appare qui più complesso e si rimanda alle relative tabelle delle tre multicentriche per un quadro più dettagliato.

OCCORRE tuttavia RIMARCARE che:

- A.3.a I sistemi che hanno utilizzato la colorazione con Rosso Ponceau sono senz'altro da scartare per insufficiente sensibilità.
- A.3.b Nell'ambito delle proposte targate Beckman PROTUR PLUS-BLU e PARAGON SPE-BLU sembrano raggiungere una sensibilità migliore rispetto a PROTUR HISI-VIOLETTO.
- A.3.c Nell'ambito dei sistemi con colorazione con oro colloidale quelli della HELENA e della GELMAN – DASIT sembrano raggiungere una migliore sensibilità.
- A.3.d In generale la sensibilità è risultata discreta MA AFFETTA DA ECCESSIVA VARIABILITÀ intra ed inter laboratorio anche a parità di metodo/sistema. Questo si è riscontrato soprattutto per i Kit Hydragel 15-30 violetto della CIAMPOLINI, che, peraltro, hanno mostrato di poter raggiungere una buona sensibilità.

B. TEST DI CONFERMA

B.1 IMMUNOFISSAZIONE

B.2 Anche qui, specie oltre un certo limite, si è notata una certa variabilità (vedi tabelle riassuntive) sia in ragione della variabilità elettroforetica precedentemente illustrata sia in relazione al tipo ed alla qualità degli antisieri utilizzati.

Raccomandazioni principali derivate dalla sperimentazione

Premesso che:

- A. Sembrerebbe opportuno, anche per uniformare le prestazioni dei Laboratori Liguri, che i protocolli non siano molto diversi tra loro in termini di sensibilità.
- B. Si conviene altresì che il Laboratorio debba poter arrivare ad una sensibilità almeno di 1 mg/dl per consentire l'individuazione di patologie molto gravi e relate ad escrezioni anche molto modeste di BJP.
- C. D'altro canto, nello stabilire il limite di sensibilità del test di screening, occorre tenere presente la presenza frequente di CLL policlonali in modesta quantità e non collegabili a patologie di rilievo nonché l'altro numero di richieste per contrastografia.
- D. In questi casi alcuni di noi ritengono più opportuno considerare per lo screening una soglia più bassa di sensibilità assumendosene la responsabilità con l'adozione del tipo di refertazione riportato sotto e che esplicita chiaramente questa scelta.
- E. UNA POSITIVITÀ AD UN TEST DI SCREENING NON VA MAI AUTOMATICAMENTE INTESA COME POSITIVITÀ DI BJP SE NON CONFERMATA DA IMMUNOFISSAZIONE.

dai risultati ottenuti si possono dedurre le seguenti raccomandazioni:

1. Chi fa uso per lo screening di tecniche elettroforetiche, e comunque tutti per l'ImmunoFissazione che dovrebbe essere ritenuta tecnica di conferma, dovrebbe **CONTROLLARE**, coinvolgendo anche le Case Produttrici, che i parametri ed i programmi degli strumenti, nonché la qualità degli antisieri, siano tali da garantire i migliori risultati possibili in termini di sensibilità.
Ad esempio, sarebbe utile verificare "in casa" i parametri per HYDRASYS inviati da Pordenone che ha ottenuto risultati molto buoni.
2. Controlli periodici sono consigliabili sempre e potranno essere eseguiti con i campioni della Multicentrica.
3. **SI RACCOMANDA IL CONTROLLO PER SCELTE IN OCCASIONE DI GARE.**
4. Come già convenuto si dovrebbe usare il seguente schema di refertazione:

Schema di referto

Nome del Test: Ricerca della Proteina di Bence Jones

Test di screening:

Campione: urina estemporanea (o altro)

Metodo sensibilità mg/dl)

Risultato Negativo

Necessità di test di conferma

Test di conferma:

Campione: urina estemporanea (o altro)

Metodo sensibilità mg/dl)

Tempo di attesa per risultato definitivo:

Risultato:

5. Proposta operativa

Una proposta potrebbe forse essere questa:

- Adottare sempre un metodo di screening ad alta sensibilità ma a fronte di modesti segni di positività comportarsi come segue:
- Proseguire la ricerca con l'immunofissazione per tutti i pazienti clinicamente sospetti o con CM nel siero ovvero del tutto sconosciuti e dei quali non sia possibile aver notizie cliniche.
- Peraltro, dato che talora la sensibilità dello screening si è mostrata superiore a quella del test di conferma, sarà bene, **IN CASO DI FORTE SOSPETTO CLINICO**, ripetere il test di conferma su campione opportunamente concentrato prima di dare risposta negativa.

- ❑ Nel caso di pazienti conosciuti e clinicamente non sospetti, esprimere i risultati riferendosi a soglie più basse di sensibilità, per esempio: 2 o 4 mg/dl, da esprimere comunque nel referto e suggerire di ripetere l'esame dopo due mesi.

Elementi per valutazioni future

Premesse

Se, come valutazione della sensibilità abbiamo raggiunto l'obiettivo prefissato, resta credo ulteriormente da verificare l'efficacia dei diversi protocolli di screening utilizzati (cioè la verifica del numero dei falsi positivi) anche in termini di costi materiali ed organizzativi.

Ma, a parte questo, credo sia il momento di porci fondamentalmente questo secondo obiettivo: Valutazione dei sistemi di QUANTIZZAZIONE della BJP in termini di AFFIDABILITÀ e RIPRODUCIBILITÀ.

La valutazione quantitativa delle BJP si dovrebbe eseguire sia nel caso di malattia conclamata e suo trattamento sia nel caso di BJP e/o CM nel siero non associate a malattia al fine di evidenziare le variazioni di livello (si ricorda in proposito l'altro numero di MGUS rilevate nella popolazione con l'aumento delle classi di età).

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

Il College of American Pathologists ad esempio propone (linea guida n. 6) intervalli da 1 a 2 mesi per pazienti affetti da Mieloma Multiplo, Macroglobulinemia di Waldenström's o AL ed ogni anno per MGUS con CM di basso livello.

Lo stesso CAP (linea guida n. 5) propone, in tema di valutazione quantitativa della BJP, la determinazione della Proteinuria delle 24 ore seguita da densitometria ed immunofissazione dei campioni concentrati 100 volte.

In Italia le indicazioni venute dalla Commissione Proteine Sibioc sono state ugualmente Proteinuria e densitometria, ma su campione indiluito.

Nelle nostre Multicentriche la determinazione della Proteinuria con i metodi commerciali di routine è porsa poco affidabile perché priva di accuratezza anche nella serie già per valori intorno ai 20 mg/dl peggiorando per valori inferiori, (tale inaccuratezza non è caratteristica delle urine con BJP ma il Gruppo di Forlì l'ha riscontrata anche in un campione con semplice Proteinuria Glomerulare) mentre, data la scelta per la Multicentrica di campioni con BJP praticamente pura, non sono state eseguite letture densitometriche.

Tenuto conto di queste prime esperienze, considerate le indicazioni ed avendo ben presenti le notevoli difficoltà della misurazione delle BJP (vede anche documento conclusivo riunione del 14/11/97), riteniamo che la via da seguire sia quella sperimentale come già per la valutazione della sensibilità e riproducibilità.

Proposte

- a) In pratica per il 2000-2001 proponiamo una multicentrica dedicata alla quantizzazione di 5-6 campioni con BJP da valutare come tali e non diluiti a diluiti quel tanto che basti alla distribuzione ai partecipanti. L'ideale sarebbe che alcuni di tali campioni avessero oltre alla BJP anche altre proteine ed che vi fossero campioni dello stesso paziente presi in momenti diversi rispetto alla terapia.

I campioni saranno sottoposti ai Laboratori partecipanti INDILUITI (o diluiti quel tanto che necessita per la stabilizzazione e la distribuzione) e l'auspicio è di estendere il più possibile la sperimentazione anche attraverso un eventuale coinvolgimento della Commissione Poetino SiBioc.

Per questi campioni si richiederà:

- ❑ Dosaggio della Proteinuria
- ❑ Lettura densitometrica con invio del tracciato (ove i Laboratori siano attrezzati)
- ❑ Dosaggio per via immunometrica di: albuminuria (in quanto si considera l'albumina come proteina di riferimento), Transferrina, IgG,

- ❑ Dosaggio delle Catene Leggere Totali e/o Libere a seconda dei metodi immunometrici in uso nei vari Laboratori.

L'ANALISI DEI RISULTATI SARÀ LA BASE PER FORMULARE INDICAZIONI IN MATERIA DI VALUTAZIONE QUANTITATIVA.

- b) Per il 2000-2001 ci proponiamo anche il rinvenimento ed invio ai partecipanti di un campione di urina con CM costituita da Immunoglobulina intera e CM costituita da Catene Leggere Libere sovrapposte.
Per questo campione chiederemo l'esecuzione di elettroforesi ed immunofissazione in uso nel Laboratorio
- c) Sembra infine opportuna la verifica attraverso un questionario da sottoporre anche ai reparti di Medicina ed Ematologia delle richieste di valutazione quantitativa delle BJP che pervengono (o potrebbero pervenire).

Altre questioni emerse (sinteticamente)

- ❑ Proposta di diluizione spinta per una migliore quantizzazione delle CM.
- ❑ Linee guida anche in piccolo per uniformità Liguria.
- ❑ Questione specificità antisieri anti Catene Leggere Libere.
- ❑ Tossicità comunque CLL ?
- ❑ Proposta, per le contrastografie di pazienti con CLL e/o BJP, di idratazione o di uso di farmaci opportuni.