La misura delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero: aspetti analitici e clinici

Riccardo Albertini, Giampaolo Merlini
Laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Laboratori Sperimentali di Ricerca di Biotecnologie, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Dipartimento di Biochimica, Università degli Studi, Pavia

ABSTRACT

Determination of free light chains in serum: analytical and clinical aspects. The measurement of serum free light chains (FLC) is thoroughly used in the evaluation of monoclonal gammopathies. However, the FLC assay presents some analytical issues that should be taken into account in the interpretation of results. International guidelines have been formulated for the appropriate use of the FLC assay in clinical practice. The combination of all the available analytical tools, including serum and urine electrophoresis and immunofixation and the FLC assay, provides the best diagnostic sensitivity in different clinical settings.

INTRODUZIONE

Le immunoglobuline presenti nel sangue sono sintetizzate dalle cellule B e dalle plasmacellule residenti nel midollo osseo emopoietico. Durante la loro sintesi vi è un eccesso di produzione di catene leggere libere (FLC) policlonali che sono rapidamente eliminate dal rene (emivita, 2-6 ore). In analogia con altri processi di filtrazione per via renale, la clearance delle catene κ e λ è influenzata dall'eventuale stato di aggregazione delle medesime nel siero; le catene k, prevalentemente monomeriche, hanno una clearance tre volte piu' rapida di quelle λ. Pertanto, la concentrazione plasmatica delle λ è leggermente superiore a quella delle κ, nonostante queste ultime siano sintetizzate in quantità maggiore.

La concentrazione plasmatica delle FLC può aumentare per ridotta clearance in presenza di insufficienza renale o per incremento della loro sintesi, quando vi è una iperproduzione di immunoglobuline, policlonali in corso di malattie infettive e autoimmuni, o monoclonali in presenza di un clone B linfocitario/plasmacellulare. Il rapporto κ/λ è generalmente utilizzato come marcatore di clonalità, anche se alcune cautele devono essere avanzate a questo proposito, poiché è stato descritto che il 14% dei pazienti con incremento policlonale delle IgG avevano un rapporto κ/λ anomalo, specialmente in caso di funzione renale compromessa (1). La presenza di FLC monoclonali nelle urine costituisce la cosiddetta proteinuria di Bence Jones, dal nome del medico londinese che pubblicò il peculiare comportamento al riscaldamento delle urine di un giovane uomo affetto da "mollities ossium" o mieloma multiplo (2, 3). Le FLC monoclonali sono marcatori tumorali di grande utilità clinica e per questo sono stati proposti numerosi metodi per la loro misura riportati in un documento del Gruppo di Studio Proteine della SIBioC pubblicato su questo giornale nel 2001 (4).

Lo sviluppo di un metodo per la misura delle FLC è stato particolarmente difficoltoso a causa di due ostacoli fondamentali: l'unicità antigenica delle immunoglobuline monoclonali e la loro modestissima concentrazione rispetto alle catene leggere legate alle immunoglobuline complete. La produzione di anticorpi ad alta affinità specifici per gli epitopi delle catene leggere, che sono solitamente nascosti dal contatto con la catena pesante e che sono esposti solo nelle FLC (Figura 1), è stata ingegnerizzata in pecore rese tolleranti nei confronti degli antigeni di superficie delle catene leggere legate alle immunoglobuline complete attraverso protocolli di tolerizzazione intensiva. Le pecore tolerizzate sono state successivamente immunizzate con proteine κ e λ purificate da urine contenenti proteina di Bence Jones ed hanno prodotto anticorpi policlonali ad alta affinità e diretti solo contro gli epitopi nascosti delle catene leggere. Questi anticorpi sono stati quindi utilizzati per la produzione di un saggio immunochimico automatizzabile per la misura delle FLC nei liquidi biologici (5). Questo metodo (reagente Freelite, The Binding Site) è ora ampiamente utilizzato nella pratica clinica (6).

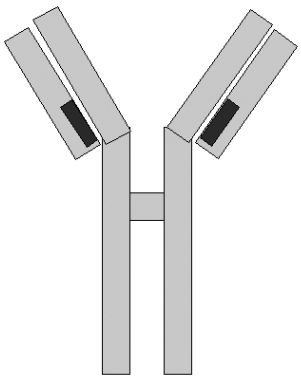


Figura 1
Schema di struttura di una immunoglobulina. Gli epitopi nascosti delle catene leggere sono indicati in nero.

ASPETTI ANALITICI

Dalla sua introduzione nei laboratori diagnostici nel 2001, il metodo Freelite ha mostrato alcuni limiti: la non assoluta specificità nei confronti delle FLC rispetto a quelle legate, un'elevata imprecisione fra diversi lotti di reagente, e la mancanza di linearità delle diluizioni delle FLC monoclonali. Questi problemi sono stati recentemente analizzati da Tate et al. (7).

Grazie alla collaborazione fra i produttori del metodo Freelite e i laboratoristi utilizzatori sono state tuttavia intraprese azioni per correggere i problemi sopra riportati. I problemi di specificità osservati nelle prime versioni del metodo sono stati significativamente migliorati con avanzamenti nella tecnologia di produzione degli anticorpi (8). I dati correnti indicano che la crossreattività con le immunoglobuline normali causa una sovrastima di circa il 10% quando la concentrazione delle FLC è nell'ambito fisiologico (8, 9).

Le specifiche dell'imprecisione desiderabile nella misura delle FLC non sono state ancora definite. Studi preliminari condotti con il metodo Freelite indicano una bassa variabilità biologica intraindividuale nei soggetti sani (CV <2,5%) con la conseguente necessità di ridurre l'imprecisione del metodo FLC (10). Uno studio riporta un'imprecisione determinata su diversi lotti di reagente Freelite con CV compresi fra 8% e 45% per la misura della concentrazione delle FLC e fra 17% e 32% per il rapporto κ/λ (11). Il produttore è impegnato a ridurre l'imprecisione attraverso la produzione di lotti sempre più grandi e con ricerche orientate a comprendere le cause di questa elevata variabilità analitica fra lotti di reagente (12).

Sono state proposte procedure che tengono conto della mancanza di linearità nella determinazione delle FLC monoclonali. Per i metodi basati su strumenti Immage (Beckman Coulter) e BNII (Siemens), che presentano intervalli di misura simili, Tate et al. hanno proposto il seguente schema di diluizione in aggiunta a quella già presente nella metodica strumentale (7): se la concentrazione iniziale delle FLC κ è >50 mg/L o delle FLC λ è >100 mg/L, ma inferiore al limite superiore di misura del metodo, rimisurare il campione alla diluizione immediatamente superiore; se il risultato di questa diluizione non cade nell'intervallo 10-50 mg/L per le FLC κ o 10-100 mg/L per le FLC λ, ripetere di nuovo la misura alla diluizione più alta successiva. Questa procedura comporta un aumento del 6-10% delle diluizioni richieste per ciascuna corsa analitica.

E' necessario inoltre ricordare che, anche se l'intervallo di misura delle FLC è 1-100.000 mg/L, esiste la possibilità di incorrere nel fenomeno di eccesso di antigene con il rischio di mancare la diagnosi di una malattia che invece richiederebbe interventi terapeutici immediati.

ASPETTI CLINICI

In questi ultimi anni la misura delle FLC è entrata nella pratica clinica per la gestione dei soggetti con gammopatia monoclonale, anche se non sempre il suo impiego è stato appropriato rispetto alle esigenze cliniche (13). Per questo l'"International Myeloma Working Group" ha recentemente formulato le linee guida per il corretto utilizzo dell'esame nei pazienti con mieloma multiplo e condizioni correlate, distinguendo le applicazioni che si sono dimostrate utili in base all'evidenza scientifica da quelle che sono ancora oggetto di studio (6).

Lo screening per la presenza di una gammopatia monoclonale, in associazione con l'elettroforesi proteica e l'immunofissazione del siero, rappresenta una delle indicazioni principali. La necessità di analizzare anche le urine in questo contesto è ancora oggetto di dibattito. Uno studio dei ricercatori della Mayo Clinic indica che l'immunofissazione delle urine poco aggiunge alla sensibilità diagnostica della accoppiata FLC più immunofissazione del siero (14). Lo stesso gruppo ha analizzato la sensibilità diagnostica per l'identificazione di una gammopatia monoclonale di diverse combinazioni delle 5 indagini standard (elettroforesi proteica e immunofissazione del siero e delle urine e la misura delle FLC) eseguite in 1877 pazienti con discrasia plasmacellulare (15). Il solo utilizzo dell'elettroforesi del siero associata alla misura delle FLC non riduceva la sensibilità diagnostica per il mieloma multiplo, per la macroglobulinemia di Waldenström e per la malattia da deposito delle catene leggere (LCDD), mentre si osservava una riduzione della sensibilità del 8% per le gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS), del 23% per la sindrome POEMS (caratterizzata da polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, presenza di una componente monoclonale e alterazioni cutanee), del 4% per il plasmocitoma, del 1% per l'amiloidosi da catene leggere monoclonali (AL) e dello 0,5% per il mieloma "smoldering" (Tabella 1). In particolare, questi Autori hanno confermato la nostra precedente osservazione sulla necessità di eseguire l'immunofissazione anche delle urine per poter raggiungere una sensibilità diagnostica ottimale nei soggetti nei quali si sospetti l'amiloidosi AL (16). Recenti lavori riportano una migliore sensibilità diagnostica per il mieloma multiplo delle FLC rispetto all'elettroforesi delle sieroproteine (17). L'analisi retrospettiva di 691 pazienti sottoposti a screening per una sospetta gammopatia monoclonale ha tuttavia mostrato che l'omissione della immunofissazione del siero dal gruppo di esami che comprendeva l'elettroforesi e l'immunofissazione del siero e la misura delle FLC si associava ad una significativa riduzione della sensibilità diagnostica (18).

La misura delle FLC è inoltre utile come marcatore prognostico alla diagnosi nei pazienti con MGUS (19), nei pazienti con mieloma "smoldering" (20), nel mieloma solitario dell'osso (21), nel mieloma multiplo (6) e nell'amiloidosi AL.

Ancora, la determinazione delle FLC nel siero è indicata per il monitoraggio della risposta terapeutica nei mielomi oligosecernenti e nell'amiloidosi AL. In questa ultima condizione, le FLC rappresentano non solo un

Tabella 1
Sensibilità diagnostica (%) per la diagnosi di gammopatia monoclonale di varie combinazioni di esami (modificata da rif. 15)

	PEL e IFE del siero + IFE urine	PEL e IFE del siero + FLC	PEL siero + FLC	IFE siero	PEL siero	FLC siero	Tutti gli esami
Tutte le diagnosi	97,0	97,4	94,3	87,0	79,0	74,3	98,6
Mieloma multiplo	98,7	100,0	100,0	94,4	87,6	96,8	100,0
Macroglobulinemia	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	73,1	100,0
Mieloma "smoldering"	100,0	100,0	99,5	98,4	94,2	81,2	100,0
MGUS	100,0	97,1	88,7	92,8	81,9	42,4	100,0
Plasmocitoma	89,7	89,7	86,2	72,4	72,4	55,2	89,7
Sindrome POEMS	96,8	96,8	74,2	96,8	74,2	9,7	96,8
Plasmocitoma extramidollare	20,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	20,0
Amiloidosi AL	94,2	97,1	96,2	73,8	65,9	88,3	98,1
LCDD	77,8	77,8	77,8	55,6	55,6	77,8	83,3

PEL, elettroforesi proteica; IFE, immunofissazione; FLC, catene libere leggere; MGUS, gammopatie monoclonali di incerto significato; LCDD, malattia da deposito delle catene leggere.

marcatore della malattia, ma la causa stessa della malattia, e la misura delle FLC è un pilastro fondamentale per la gestione del paziente. Dati recenti dimostrano che nei pazienti con amiloidosi AL, trattati con trapianto di cellule staminali autologhe, la misura delle FLC, e non della immunoglobulina monoclonale completa, è importante nel definire la risposta alla terapia e la prognosi (22).

Nei pazienti con mieloma multiplo è stato proposto di introdurre la normalizzazione del rapporto κ/λ per definire una risposta completa come "stringente" (23). Tuttavia, uno studio recente ha dimostrato che un rapporto κ/λ normale si può associare ad una componente monoclonale residua (24). Ulteriori studi prospettici sono quindi necessari per valutare se la "risposta completa stringente" rappresenti veramente una più robusta risposta alla terapia.

Infine, per il monitoraggio della terapia nei pazienti con mieloma multiplo non ci sono evidenze a supporto dell'impiego della misura delle FLC in sostituzione dell'elettroforesi delle proteine eseguita su un campione di urine delle 24 ore. Nei pazienti con una malattia misurabile attraverso l'elettroforesi del siero o delle urine non vi sono evidenze a supporto dell'uso della determinazione delle FLC (6).

CONCLUSIONI

La possibilità di misurare le FLC nel siero è una risorsa importante per la cura dei soggetti con gammopatia monoclonale. E' tuttavia necessario tenere conto dei problemi analitici ancora aperti nell'interpretazione dei risultati. Il metodo commerciale è oggetto di continui miglioramenti, che richiedono una stretta collaborazione con il laboratorista utilizzatore. I dati della letteratura indicano che la migliore sensibilità diagnostica per le gammopatie monoclonali si ottiene combinando tutte le tecnologie a disposizione, quali elettroforesi e immunofissazione del siero associate alla misura delle FLC. Infine, anche se alcuni recenti lavori insistono sulla marginalità diagnostica dello studio delle urine, crediamo necessario eseguire sempre l'immunofissazione delle urine in presenza di un fondato sospetto clinico.

BIBLIOGRAFIA

1. Hill PG, Forsyth JM, Rai B, et al. Serum free light chains: an alternative to the urine Bence Jones proteins screening test for monoclonal gammopathies. Clin Chem 2006;52:1743-8.
2. Jones HB. Papers on Chemical Pathology, Lecture III. Lancet 1847;II:88-92.
3. Jones HB. On the new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1848;138:55-62.
4. Graziani MS, Merlini G, Petrini C. Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. Biochim Clin 2001;25:23-32.
5. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. Clin Chem 2001;47:673-80.
6. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. Leukemia 2009;23:215-24.
7. Tate J, Bazeley S, Sykes S, et al. Quantitative serum free light chain assay - analytical issues. Clin Biochem Rev 2009;30:131-40.
8. Nakano T, Komoda T, Nagata A. Immunochemical quantification of free immunoglobulin light chains from an analytical perspective. Clin Chem Lab Med 2006;44:522-32. Comment in: Clin Chem Lab Med 2007;45:264-5; author reply 266-7.
9. Robson E, Mead G, Carr-Smith H, et al. Analytical performance of serum free light-chain assay during monitoring of patients with monoclonal light-chain diseases. Clin Chim Acta 2007;376:30-6. Comment in: Clin Chim Acta 2007;380:247; author reply 250-1.
10. Tate JR, Gill D, Cobcroft R, et al. Practical considerations for the measurement of free light chains in serum. Clin Chem 2003;49:1252-7.

11. Tate JR, Mollee P, Dimeski G, et al. Analytical performance of serum free light-chain assay during monitoring of patients with monoclonal light-chain diseases. Clin Chim Acta 2007;376:30-6.
12. Merlini G. Serum-free light chain analysis: works in progress. Clin Chem Lab Med 2009;47:1021-2.
13. Dolci A, Infusino I, Mozzi R, et al. Indicazioni per il corretto impiego delle indagini biochimiche nelle gammopatie monoclonali con particolare riferimento alla determinazione delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero. Biochim Clin 2008;32:564-8.
14. Katzmann JA, Dispenzieri A, Kyle RA, et al. Elimination of the need for urine studies in the screening algorithm for monoclonal gammopathies by using serum immunofixation and free light chain assays. Mayo Clin Proc 2006;81:1575-8.
15. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. Clin Chem 2009;55:1517-22.
16. Palladini G, Russo P, Bosoni T, et al. Identification of amyloidogenic light chains requires the combination of serum-free light chain assay with immunofixation of serum and urine. Clin Chem 2009;55:499-504.
17. Sthaneshwar P, Nadarajah V, Maniam JAS, et al. Serum free light chains: diagnostic and prognostic value in multiple myeloma. Clin Chem Lab Med 2009;47:1101-7.
18. Boer K, Deufel T. Quantitation of serum free light chains does not compensate for serum immunofixation only when screening for monoclonal gammopathies. Clin Chem Lab Med 2009;47:1109-15.
19. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. Blood 2005;106:812-7.
20. Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. Blood 2008;111:785-9.
21. Dingli D, Kyle RA, Rajkumar SV, et al. Immunoglobulin free light chains and solitary plasmacytoma of bone. Blood 2006;108:1979-83.
22. Kumar S, Gertz MA, Lacy M, et al. Changes in serum free light chain rather than intact monoclonal immunoglobulin levels predict outcome with therapy in patients with light chain amyloidosis. Blood 2009;114:747.
23. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. Leukemia 2006;20:1467-73.
24. Singhal S, Vickrey E, Krishnamurthy J, et al. The relationship between the serum free light chain assay and serum immunofixation electrophoresis, and the definition of concordant and discordant free light chain ratios. Blood 2009;114:38-9.