

Aspetti metodologici nella ricerca e caratterizzazione delle componenti monoclonali nel siero

Alberto Dolci¹, Aialdo Vernocchi² per il Gruppo di Studio SIBioC Proteine

¹Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera "Luigi Sacco", Milano

²Centro di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica MultiLab, IRCCS MultiMedica, Milano

ABSTRACT

Methodological issues in detection and typing of serum monoclonal components. Serum protein electrophoresis (SPE) is a screening test widely used in clinical practice to identify patients with monoclonal gammopathies. SPE, performed on agarose gel (AGE) or by capillary zone electrophoresis (CZE), is the only technique able to recognize a monoclonal immunoglobulin. To detect monoclonal components (MC), SPE must be visually inspected. The two available techniques show similar sensitivity for MC detection (CZE 95%, AGE 91%), with a higher specificity for AGE (99% vs. 78% for CZE). Any MC detected must be reported, because also small B-cell clones could be dangerous. Once detected, MCs need to be quantitatively measured directly on the SPE pattern by setting the limits of the corresponding peak. A concentration-related bias in MC quantitation between AGE and CZE exists. Immunotyping is the further mandatory test for confirmation and characterization of MC by either immunofixation (IFE) or immunosubtraction (ISE). In general, IFE is more sensitive than ISE, but high resolution (HR-IFE) must be warranted. However, ~25% of IFE carried out on commercially available kits are difficult to interpret and thus not reportable. For identification of amyloidogenic light chain MC, sensitivity of the manual HR-IFE is 95% vs. 80% of conventional semiautomated assays. The recently introduced quantitative serum assay for immunoglobulin free light chains (FLC) is an accurate index of clonality, particularly for FLC myeloma and AL amyloidosis. To reach the highest sensitivity in MC detection a comprehensive screening panel including SPE, HR-IFE and FLC determination is recommended.

ELETTROFORESI DELLE SIEROPROTEINE

L'elettroforesi delle sieroproteine (EF) è un'analisi eseguita praticamente in tutti i servizi di Medicina di Laboratorio sia intra- che extra-ospedalieri. Il traguardo diagnostico più importante che l'EF permette di raggiungere è la rilevazione delle componenti monoclonali (CM) nel siero e il loro successivo monitoraggio nel tempo, tramite quantificazione della CM sul tracciato (1). Non esistono tecniche alternative alla EF per la definizione della monoclonalità di una immunoglobulina. Tuttavia, la stima del rapporto κ/λ delle catene leggere libere (FLC), determinate con metodi immunochimici in fase liquida, costituisce un efficace marcatore di clonalità, molto più sensibile dell'EF nel rilevare le CM di FLC (2).

Le tecniche utilizzate per l'EF sono EF su supporto solido, costituito da gel di agarosio (AGE), e EF in fase libera, rappresentata dalla EF capillare zonale (CZE). L'AGE può essere eseguita con sistemi manuali o analizzatori semiautomatici che, quando si avvalgono di stazioni di campionamento, sono in pratica sistemi a

completa automazione. La CZE si esegue su analizzatori automatici, chiusi (parametrizzazione non modificabile), a elevata cadenza analitica. Il dato sostanziale che si evidenzia a proposito delle due tecniche è l'enorme disomogeneità dei dati presenti in letteratura relativi alla ricerca di CM su AGE, attribuibile alle grande diversità nella qualità dei metodi in AGE utilizzati, mentre, essendo l'esecuzione della CZE limitata ad analizzatori chiusi, i dati disponibili per questa metodica sono senz'altro più omogenei.

Specifiche di qualità delle tecniche elettroforetiche per la ricerca delle CM

Risoluzione

Le linee guida attualmente disponibili per la ricerca delle CM nel siero indicano come requisito tecnico l'esecuzione di una EF ad alta risoluzione, indipendentemente dalla tecnica utilizzata, specificando che per alta risoluzione si intende la separazione in zona β della transferrina dal fattore C3 del complemento, ampiamente raggiungibile da qualsiasi tecnica di EF

Corrispondenza a: Alberto Dolci, Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera 'Luigi Sacco', Via Giovanbattista Grassi 74, 20157 Milano. Tel. 0239042290, Fax 0250319835, E-mail dolci.alberto@hsacco.it

Ricevuto: 05.01.2012

Revisionato: 11.01.2012

Accettato: 31.01.2012

supportata o capillare (3). Questo criterio dovrebbe permettere di rilevare anche le piccole CM che migrano in zona β e spesso sono difficili da separare dalle altre proteine che comigrano nella stessa zona (transferrina e fattore C3 del complemento).

Sensibilità analitica

La CZE presenta, per le caratteristiche intrinseche della tecnica, una maggiore sensibilità analitica nella rilevazione strumentale delle CM rispetto all'AGE. Infatti, dopo la separazione, la lettura spettrofotometrica a 200-214 nm delle proteine permette di ottenere una misura diretta della loro concentrazione relativa, da cui si ricava il tracciato che si valuta visivamente. Il limite di rilevabilità di CM non comigranti con altre proteine è compreso tra 0,50 e 0,75 g/L ed è condizionato dal tipo di CM, dalla zona di migrazione e dalla intensità delle immunoglobuline policlonali eventualmente presenti (4, 5). In AGE, invece, le frazioni proteiche vengono misurate densitometricamente, mediante lettura dell'intensità del colorante utilizzato per evidenziarle nel gel. Le caratteristiche analitiche di questo metodo, che fornisce una misura indiretta della concentrazione relativa dei picchi, dipendono in larga parte dall'affinità del legame delle differenti proteine con il colorante. Non va dimenticato, però, che la ricerca delle CM si esegue sul tracciato, quindi in AGE sul supporto di gel e in CZE sul grafico ricavato dall'interpolazione della lettura strumentale, per cui un confronto tra i due metodi è tecnicamente molto difficile.

Sensibilità e specificità diagnostica nella ricerca delle CM

In termini di sensibilità diagnostica nella rilevazione di CM confermate all'immunofissazione (IFE), la CZE si attesta al 95% in tre differenti studi prospettici condotti su casistiche con più di 1000 campioni (6-8), risultando lievemente superiore all'AGE, riportata al 91% (6). La CZE è più sensibile dell'AGE soprattutto nella rilevazione delle CM in zona β (8). Per entrambe le tecniche, le CM più difficili da rilevare sono ovviamente quelle a concentrazione più bassa (<3 g/L), tipicamente IgM, IgA o FLC, eventualmente comigranti con altre proteine, comprese le immunoglobuline policlonali in elevata quantità (8). Nella pratica clinica, comunque, si può affermare che i due metodi si equivalgono in termini di sensibilità diagnostica e possono quindi essere utilizzati indifferentemente nel laboratorio clinico (3, 9-11), anche se la maggiore sensibilità analitica della CZE nel rilevare minime modificazioni di segnale determina una minore specificità diagnostica del metodo, riportata al 78% contro il 99% dell'AGE (6, 8). Questo comporta che in circa il 20% dei casi le piccole modificazioni di segnale che producono immagini sospette per CM non si confermano tali all'indagine immunoelettroforetica di conferma.

Modalità di valutazione dell'EF per la ricerca delle CM

Ricerca di una CM sul tracciato dell'EF

Per rilevare la presenza di anomalie riconducibili a una CM, non solo in zona γ , ma anche in zona β , α_2 e, raramente, α_1 , si esegue la valutazione ispettiva del tracciato dell'EF. La corretta valutazione di un tracciato non dovrebbe prescindere dalla conoscenza delle notizie cliniche relative al paziente (12). L'evidente riscontro ma anche il semplice sospetto di una CM impongono sempre l'esecuzione di una indagine immunoelettroforetica per la conferma e la caratterizzazione della CM. Su tracciati di AGE sospetti per CM (CM non evidenti, γ -globuline <5,5 g/L, β -globuline nell'intervallo 16-19 g/L, α_2 -globuline ≥ 14 g/L o con morfologia atipica) pari a ~10% delle EF, sottoposti a IFE come esame riflesso, la specificità, corrispondente alle IFE positive, è del 27,7%. Il dato conferma l'efficacia di questa strategia per rilevare piccole CM, potenzialmente di grande importanza clinica, come le FLC che rappresentano il 5,2% delle IFE positive (13). Limitandosi ai tracciati senza alterazioni monoclonali evidenti, ma con γ -globuline <7 g/L, la specificità dell'AGE, definita con IFE riflessa, è del 19,3% e ben il 26,7% delle CM rilevate sono costituite da FLC (14). Non esistono dati relativi alla specificità della CZE definita con una indagine immunoelettroforetica riflessa. La necessità clinica di non perdere alcuna CM giustifica l'utilizzo della IFE come esame riflesso di questi tracciati di AGE, anche se il 70-80% delle alterazioni sospette rilevate all'AGE risulta poi negativo alla IFE. Per la stessa ragione, in presenza di un fondato sospetto clinico di malattia linfoproliferativa, anche in assenza di CM rilevabile sul tracciato di EF, è necessario eseguire l'IFE del siero e delle urine. Per raggiungere la più alta (100%) sensibilità nella ricerca delle piccole CM di FLC amiloidogenetiche, oltre alla IFE di siero e urine, è necessario eseguire anche la determinazione del rapporto κ/λ nel siero (15). Non esistono differenze sostanziali tra AGE e CZE nemmeno nella rilevazione delle CM più rare, come le IgD e quelle della malattia da catene pesanti γ (16, 17), mentre per la rara malattia da catene pesanti μ è riportato un caso rilevato in AGE ma non in CZE (18). Un approccio alternativo all'esame ispettivo del tracciato per la ricerca delle CM, applicabile solo alla CZE, i cui dati digitali possono essere facilmente elaborati, è l'utilizzo di algoritmi matematici con "software" dedicati. Tuttavia, l'unico studio multicentrico disponibile su una casistica di oltre 50.000 CZE mostra una sensibilità (93%) insufficiente a raccomandarne l'impiego, anche perché le CM non rilevate sono spesso piccole, ma potenzialmente di grande rilevanza clinica (19).

Determinazione quantitativa della CM sul tracciato dell'EF

Ogni CM rilevata alla EF va quantificata sul tracciato mediante lettura densitometrica in AGE o

spettrofotometrica in CZE. Questo approccio, pur gravato da alcuni problemi metodologici (variabilità analitica della misura delle proteine totali, accuratezza del posizionamento delle soglie di delimitazione del picco monoclonale, eventuali proteine comigranti con la CM), è l'unico raccomandabile per la quantificazione delle CM (1), criterio necessario, ma non sufficiente, per:

- porre diagnosi differenziale tra gammopatia monoclonale di incerto significato (MGUS) (CM <30 g/L) e mieloma (CM ≥30 g/L) (20);
- valutare il rischio di progressione di una MGUS verso il mieloma, che è continuo e non si stabilizza nel tempo, per cui il monitoraggio della concentrazione della CM, insieme a quello di emoglobina, calcio e creatinina nel sangue, rappresenta il criterio raccomandato per rilevare l'evoluzione verso il mieloma e disordini correlati prima che si verifichi danno d'organo (1);
- valutare in corso di mieloma e disordini correlati la risposta alla terapia (21).

La quantificazione della immunoglobulina monoclonale con metodi immunochimici è inaccurata perché il calibratore (policlonale) e il campione (monoclonale) non reagiscono allo stesso modo con l'antisiero contenuto nel saggio e perché la proteina monoclonale può presentare specificità antigeniche poco o mal riconosciute dall'antisiero stesso (1, 3). Tuttavia, in presenza di una CM IgA in zona β , la cui misura in EF è interferita dalle proteine comigranti, è ammessa la quantificazione nefelometrica delle IgA (21).

Le quantificazioni di una CM in AGE e in CZE non sono confrontabili per le differenze intrinseche dei due metodi di misura. In particolare, si rileva un "bias", indipendente dalla classe immunoglobulinica, correlato alla concentrazione della CM, con l'AGE (densitometria) che rispetto alla CZE sovrastima le CM <20 g/L, ma sottostima quelle ≥20 g/L. Questo "bias" è rilevabile con differenti sistemi di CZE (5, 22). L'imprecisione analitica (CV) della misura densitometrica delle CM è ~2,5% e dipende prevalentemente dalla variabilità interoperatore nel posizionamento dei minimi di lettura del picco monoclonale (23).

Modalità di refertazione

Ogni CM, anche la più piccola, va segnalata sul referto perché gli effetti patologici delle CM possono causare patologie manifeste anche di estrema gravità clinica, e sono del tutto indipendenti dalla concentrazione della CM (24). Ogni CM di nuovo riscontro va confermata e caratterizzata con una indagine immunoelettroforetica. La presenza di alterazioni del tracciato, compatibili con la presenza di una CM in zona α - o β -globulinica, deve essere sempre valutata con una indagine immunoelettroforetica per permettere la corretta refertazione del tracciato. Anche in assenza di CM è raccomandabile riportare un commento al tracciato che segnali al clinico che l'EF è stata valutata e non sono state rilevate CM. L'assenza di CM all'EF non esclude la presenza di una neoplasia dei B linfociti. Pertanto in

presenza di fondato sospetto clinico il medico curante deve comunque richiedere indagini più sensibili e più specifiche della EF.

INDAGINI IMMUNOELETTROFORETICHE

Le indagini immunoelettroforetiche attualmente disponibili per la caratterizzazione delle CM nel laboratorio clinico sono l'IFE (25) e l'immunosottrazione (ISE) (26) che, allo stato dell'arte, per la migrazione elettroforetica utilizzano rispettivamente l'AGE e la CZE. La tecnica EF utilizzata condiziona evidentemente la capacità risolutiva delle due tecniche, per cui tutte le indicazioni fornite in merito nella sezione precedente sull'EF, devono ritenersi valide anche per IFE e ISE. In particolare va ribadito il concetto della immodificabilità dei sistemi per ISE (sistemi chiusi), che si traduce in una migliore riproducibilità dell'ISE, accompagnata però a una scarsa flessibilità. Per contro l'IFE deve essere eseguita su una EF ad alta risoluzione (3), ma la qualità elettroforetica di molti metodi commercialmente disponibili non soddisfa questo requisito, con conseguente riduzione della capacità risolutiva e della accuratezza diagnostica dell'IFE. È sorprendente che la percentuale di IFE non interpretabili con certezza sia riportata intorno al 25% (8, 27), senza che si ritenga di dover intervenire su questo aspetto raccomandando l'utilizzo di metodi per IFE con maggiore capacità risolutiva, considerando che nella ricerca delle CM è raccomandabile l'impiego di metodi con la massima sensibilità analitica e diagnostica, specie in presenza di un fondato sospetto clinico.

Nella ricerca delle piccole CM amiloidogenetiche la sensibilità di un'IFE manuale ad alta risoluzione (lunghezza del tracciato: 6,5 cm; limite di rilevabilità di una CM: 0,05-0,15 g/L) è risultata 95% contro 80% di un metodo semiautomatico (limite di rilevabilità di una CM dichiarato dal produttore: 0,12-0,25 g/L) (15). Va anche segnalato che la combinazione di CZE per la ricerca e IFE per la conferma delle CM, frequentemente utilizzata nei laboratori clinici, richiede l'impiego di un'IFE ad alta risoluzione. In caso contrario, si rileva una minore sensibilità dell'IFE rispetto alla CZE nel riconoscere piccole CM di tipo IgG, specie in presenza di un incremento policlonale delle γ -globuline, con conseguente, spuria riduzione della specificità della CZE e difficoltà nella refertazione delle CM (28).

Come criterio generale, l'IFE si può ritenere più sensibile dell'ISE per le caratteristiche intrinseche del metodo che aggiunge proteina (l'anticorpo specifico) a proteina (la CM) anziché sottrarre, come nell'ISE. Il confronto tra metodi su 403 casi ha dimostrato che solo il 66% delle CM <5 g/L, il 95% delle CM di 5-10 g/L e il 97% delle CM >10 g/L evidenziate in IFE sono rilevate anche dall'ISE, con una sensibilità totale del 83% (29) confermata in altre casistiche più ridotte (30). Sono comunque descritte CM rilevate in ISE ma non in IFE, specialmente in zona β , che arrivano fino al 3% dei casi (6).

L'IFE è attualmente considerata il metodo di

Tabella 1

Caratteristiche a confronto dei due saggi immunochimici in fase liquida commercialmente disponibili per la determinazione delle catene leggere libere nel siero (FLC)

Caratteristica	Freelite Binding Site	N Latex FLC Siemens
Anticorpi	Policlonali da pecora tollerizzata	Monoclonali da topo
Calibratore	FLC policlonali in soluzione (singolo per ogni FLC)	FLC policlonali in soluzione (unico per entrambe le FLC)
Riferibilità metrologica	FLC policlonali purificate e misurate come proteine totali; valore trasferito a un secondo calibratore (FLC monoclonali) in RID; poi al calibratore del saggio	FLC policlonali purificate in soluzione (calibratore "master") misurate con il metodo Freelite in nefelometria; valore trasferito dal calibratore "master" al calibratore del saggio
Materiale di controllo del saggio	Singolo per ogni FLC (2 livelli)	Unico per entrambe le FLC (2 livelli)
Tecnica di misura	Turbidimetria/nefelometria amplificata al lattice	Nefelometria amplificata al lattice
Applicazioni strumentali	Numerosi sistemi analitici	Nefelometri Siemens
Intervalli di riferimento:		
• κ FLC (mg/L)	3,3 -19,4	6,7 -22,4
• λ FLC (mg/L)	5,7 -26,3	8,3 -27,0
• rapporto κ/λ	0,26 - 1,65	0,31 - 1,56

RID, immunodiffusione radiale.

riferimento per la ricerca di CM. In rari pazienti con amiloidosi AL con clone produttore FLC κ , l'IFE non evidenzia CM. Le basi molecolari di questo problema sono in corso di studio. In presenza di una CM di FLC è sempre necessario eseguire l'IFE con antisieri anti-IgD e anti-IgE per confermare che le catene leggere non sono legate alle catene pesanti di questi due isotipi. Nel caso di indisponibilità di tali antisieri il campione va inviato a un laboratorio in grado di eseguire questa specifica IFE. Infatti, la diagnosi di mieloma IgD o IgE, quest'ultimo estremamente raro, ha implicazioni cliniche completamente diverse dalla diagnosi di mieloma micromolecolare (31).

DETERMINAZIONE DELLE CATENE LEGGERE LIBERE

Come già precedentemente riportato, la stima del rapporto κ/λ delle FLC del siero è un efficace marcatore di clonalità, che deve essere compreso negli esami da eseguire per la ricerca delle CM per raggiungere la sensibilità ottimale nella diagnosi di mieloma micromolecolare, mieloma oligosecernente e amiloidosi-AL (2, 15). Il rapporto κ/λ rappresenta quindi un esame complementare alla EF e alle indagini immunoelettroforetiche e non sostitutivo di queste (32). Inoltre, è necessario adottare alcune cautele nell'interpretazione del rapporto κ/λ perché stime falsamente positive sono descritte nel 14% dei pazienti con incremento policlonale delle IgG, specialmente nel caso di funzione renale compromessa (33). Dal punto di vista analitico, il metodo Freelite (The Binding Site) dimostra un'elevata, benché non assoluta, specificità per le FLC rispetto alle catene leggere legate, che si traduce in buone sensibilità analitica e accuratezza

(34). Il metodo, tuttavia, risente ancora di un'elevata variabilità tra lotti e di una ridotta linearità nella determinazione delle FLC monoclonali (35).

La stima del rapporto κ/λ come indice di monoclonalità è raccomandata, alla luce delle evidenze disponibili, anche come marcatore prognostico alla diagnosi nei pazienti con MGUS, mieloma "smoldering", plasmocitoma solitario, mieloma multiplo e amiloidosi AL (36, 37). Al contrario, la discussione sull'utilizzo del rapporto κ/λ come biomcatore di risposta al trattamento del mieloma multiplo per definire una "risposta completa stringente" è ancora aperta. Nel monitoraggio della terapia, invece la determinazione delle FLC è raccomandata nei pazienti in cui non è possibile misurare la CM nel siero o nelle urine mediante tecniche di EF, come in corso di mieloma oligosecernente e di amiloidosi AL (24, 32). In quest'ultima patologia una FLC κ o λ è la causa stessa della malattia, per cui la determinazione della sua concentrazione è di fondamentale ausilio nella gestione del paziente. Recentemente, un nuovo metodo per la determinazione delle FLC (N Latex FLC, Siemens) è stato prodotto e valutato (38). Le sue caratteristiche analitiche, confrontate con quelle del metodo Freelite, sono riassunte nella Tabella 1. In mancanza di un sistema internazionale di riferimento per la determinazione delle FLC, le evidenze disponibili, ricavate con il metodo Freelite, non sono però automaticamente trasferibili al nuovo metodo. Questo nonostante il valore del calibratore del metodo N Latex FLC sia stato assegnato utilizzando il reagente Freelite su un nefelometro Siemens, con un approccio che dovrebbe garantire una buona armonizzazione dei risultati (38).

BIBLIOGRAFIA

- Graziani MS, Dolci A, Greco C, et al per il Gruppo di Studio "Proteine" della SIBioC. Indicazioni per la richiesta di elettroforesi sieroproteica. *Biochim Clin* 2008;32:48-51.
- Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2009;55:1517-22.
- Keren DF. Procedures for the evaluation of monoclonal immunoglobulins. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:126-32.
- Jolliff CR, Blessum CR. Comparison of serum protein electrophoresis by agarose gel and capillary zone electrophoresis in a clinical setting. *Electrophoresis* 1997;18:1781-4.
- Gay-Bellile C, Bengoufa D, Houze P, et al. Automated multicapillary electrophoresis for analysis of human serum proteins. *Clin Chem* 2003;49:1909-15.
- Katzmann JA, Clark R, Sanders E, et al. A. Prospective study of serum protein capillary electrophoresis immunotyping of monoclonal proteins by immunosubtraction. *Am J. Clin Pathol* 1998;110:503-9.
- Bossuyt X, Marien G. False-negative results in detection of monoclonal proteins by capillary zone electrophoresis: A prospective study. *Clin Chem* 2001;47:1477-9.
- Mariën G, Vranken G, Demuylder M, et al. Clinical capillary zone electrophoresis of serum proteins: balancing high sensitivity and high specificity. *Clin Chem* 2003;49:1419-20.
- Bossuyt X. Separation of serum proteins by automated capillary zone electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:762-72.
- McCudden CR, Mathews SP, Hainsworth SA, et al. Performance comparison of capillary and agarose gel electrophoresis for the identification and characterization of monoclonal immunoglobulins. *Am J Clin Pathol* 2008;129:451-8.
- Infusino I, Dolci A, Panteghini M. Confronto tra due sistemi per elettroforesi capillare e in gel d'agarosio per la ricerca e caratterizzazione di componenti monoclonali nel siero. *Biochim Clin* 2008;32:554-8.
- Merlini G, Marciano S, Gasparro C, et al. The Pavia approach to clinical protein analysis. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:1025-8.
- Katzmann JA, Stankowski-Drengler TJ, Kyle RA, et al. Specificity of serum and urine protein electrophoresis for the diagnosis of monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2010;56:1899-900.
- Lakshminarayanan R, Li Y, Janatpour K, et al. Detection by immunofixation of M protein in hypogammaglobulinemic patients with normal serum protein electrophoresis results. *Am J Clin Pathol* 2007;127:746-51.
- 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.
- Righetti G, Graziani MS. Sei casi di gammopatia monoclonale IgD. *Biochim Clin* 2011;35:417-22.
- Luraschi P, Infusino I, Zorzoli I et al. Heavy chain disease can be detected by capillary zone electrophoresis. *Clin Chem* 2005;51:247-9.
- Mariën G, Verhoef G, Bossuyt X. Detection of heavy chain disease by capillary zone electrophoresis. *Clin Chem* 2005;51:1302-3.
- Ognibene A, Graziani MS, Caldini A, et al. Computer-assisted detection of monoclonal components: results from the multicenter study for the evaluation of CASPER (Computer Assisted Serum Protein Electrophoresis Recognizer) algorithm. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1183-8.
- International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003;121:749-57.
- Durie BGM, Harousseau JL, Miguelet JS, et al. on behalf of International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-73.
- Mussap M, Pietrogrande F, Ponchia S, et al. Measurement of serum monoclonal components: comparison between densitometry and capillary zone electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:609-11.
- Luraschi P, Infusino I, Merlotti C, Franzini C. Analytical variation in the measurement of serum monoclonal component by capillary electrophoresis. *Clin Chim Acta* 2004;349:151-6.
- Merlini G. Perché è importante identificare e segnalare le piccole componenti monoclonali. *Biochim Clin* 2012;36:25-8.
- Alper CA, Johnson AM. Immunofixation electrophoresis: a technique for the study of protein polymorphism. *Vox Sang* 1969;17:445-52.
- Aguzzi F, Poggi N. "Immunosubtraction" electrophoresis: a simple method for identifying specific proteins producing the cellulose acetate electrophoretogram. *Boll Ist Sieroter Milan* 1977;56:212-6.
- Bossuyt X, Mariën G. Detection of monoclonal proteins by capillary zone electrophoresis: comparison of 2 multichannel automated systems. *Clin Chem* 2007;53:152-3.
- Pateri F, Dolci A. L'elettroforesi capillare è più sensibile dell'immunofissazione nel rilevare componenti monoclonali IgG. *Biochim Clin* 2005;29:224.
- Bienvenu J, Graziani MS, Arpin F, et al. Multicenter evaluation of the Paragon CZE 2000 capillary zone electrophoresis system for serum protein electrophoresis and monoclonal component typing. *Clin Chem* 1998;44:599-605.
- Keularts IM, Beunis MH, van Oord J, et al. Detection and identification of low-concentration M proteins with CZE/IS; a 'dry' analysis. *Ann Clin Biochem* 2005;42:133-5.
- Harke L, Chan C, Bhagavan NV, et al. A healthy young man presenting with multiple rib fractures. *Clin Chem* 2010;56:1390-3.
- 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.
- Albertini R, Merlini G. La misura delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero: aspetti analitici e clinici. *Biochim Clin* 2010;34:26-9.
- 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.
- Tate JR, Bazeley S, Sykes S, et al. Quantitative serum free light-chain assay - analytical issues. *Clin Biochem Rev* 2009;30:131-40.
- Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chains analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-24.

37. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV, et al. for the International Myeloma Working Group. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia* 2010;24:1121-7.
38. Te Velthuis H, Knop I, Stam P, et al. N Latex FLC – new monoclonal high-performance assays for the determination of free light chain kappa and lambda. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:1323-32.