Revisione e aggiornamento del documento di consenso SIBioC per la ricerca e quantificazione della proteina di Bence Jones

Patrizia Natali[1], Giovanni Cigliana[2], Marcella Savoia[3], Silvia Gelsumini[4], Umberto Basile[5], Arialdo Vernocchi[6], Maria Stella Graziani[7], Michele Mussap[8], Giovanni Palladini[9]

[1]Dipartimento Interaziendale ad Attività Integrata di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Azienda Ospedaliero Universitaria e Azienda Sanitaria Locale di Modena
[2]Patologia Clinica, Istituto Nazionale Tumori Regina Elena, IRCCS, Roma
[3]Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II e Dipartimento Medicina di Laboratorio AOU Federico II, Napoli
[4]UOC SMeL2 Analisi Chimico Cliniche ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo
[5]Dipartimento Medicina di Laboratorio, Policlinico Universitario A. Gemelli, IRCCS Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
[6]Servizio di Medicina di Laboratorio, IRCCS MultiMedica, Milano
[7]Sezione di Biochimica Clinica, Università di Verona
[8]Medicina di Laboratorio, Unità di laboratorio molecolare, Dipartimento di Scienze Chirurgiche - Università di Cagliari
[9]Policlinico San Matteo, IRCCS - Pavia

ABSTRACT

Update of the Italian Society of Clinical Biochemistry (SIBioC) Consensus document on the detection and quantification of the Bence Jones protein.

Bence Jones protein (BJP) refers to urine monoclonal free immunoglobulin light chains produced by the clonal expansion of a plasma cell in the bone marrow. BJP is strongly associated with systemic amyloidosis AL, light chain deposition disease, and multiple myeloma; less frequently, BJP may be recognized either in patients with monoclonal gammopathies of uncertain significance (MGUS) and with other plasma cell dyscrasias or in patients with malignant non-Hodgkin's lymphomas and chronic lymphocytic leukemia. This paper contains updated recommendations for the detection and the measurement of BJP in clinical practice from the Working Group “Proteins” of the Italian Society of Clinical Biochemistry (SIBioC), with specific indications for improving all the steps of the preanalytical, analytical, and postanalytical phases. The first morning void is the urine sample recommended for BJP detection, while 24-hours urine collection is preferred for BJP quantification. Native urine cannot be used for samples with low or very low content in urine total protein; in these cases, samples should be concentrated by using specific disposables, such as ultrafiltration membranes retaining proteins with molecular weight around 10 kDa. The required degree of concentration may vary according to sensitivity of the electrophoretic method utilized and the protein content of the sample. The detection of BJP may be performed directly by the recommended method agarose gel immunofixation (IFE) with specific polyvalent immunoglobulin antisera IgG-IgA-IgM, total κ and λ light chains; alternatively, an electrophoretic screening may be acceptable to rule out negative test results. However, positive test results should be confirmed by IFE. Tests based on immunometric methods can be used neither as screening test, nor for the BJP quantification; however, it could be useful for monitoring purposes, provided that the renal function of the patient is preserved. BJP measurement should be performed by the densitometric scanning of the electrophoretic peak corresponding to BJP, and results should be expressed as ratio of the BJP peak percentage to the urine total protein. Test results should be always integrated by standardized interpretative comments included in the laboratory reports.

INTRODUZIONE

La ricerca, la caratterizzazione e la quantificazione della proteina di Bence Jones (PBJ) è fondamentale per l’inquadramento e il monitoraggio del paziente affetto da discrasia plasmacellulare (DP) (1-7). Le DP sono un gruppo eterogeneo di patologie caratterizzate dalla proliferazione di un singolo clone di cellule B che

Corrispondenza a: Giovanni Palladini, Laboratorio di Biochimica, Biotecnologie e Diagnostica Avanzata, Fondazione IRCCSPoliclinico San Matteo, Viale Golgi, 19, 27100 Pavia, Tel +39-0382-502994, E-mail giovanni.palladini@unipv.it

Ricevuto: 16.07.2020 Revisionato: 17.07.2020 Accettato: 27.08.2020

Pubblicato on-line: 16.10.2020 DOI: 10.19186/BC_2020.084

produce un unico tipo di immunoglobulina (Ig) o di catena leggera libera (CLL) strutturalmente uniformi, che si evidenziano all'elettroforesi con una banda omogenea o componente monoclonale (CM), se presente in quantità sufficiente. In condizioni fisiologiche, durante la sintesi delle Ig, si produce un lieve eccesso di CLL policlonali di tipo κ o λ che, per il loro basso peso molecolare, vengono rapidamente eliminate dal rene e pertanto hanno una breve emivita plasmatica (2-6 ore) (8). Le CLL sono infatti liberamente filtrate dal glomerulo e riassorbite per oltre il 99% dal tubulo contorto prossimale; nelle urine del soggetto sano le CLL sono presenti in tracce (9). Nel paziente affetto da DP, le CLL monoclonali possono raggiungere concentrazioni elevate in circolo, al punto da superare la capacità di riassorbimento del tubulo (1-30 g/die) (3) ed essere quindi escrete con l'urina, dando così origine alla PBJ (10-12).

La ricerca della PBJ rappresenta una delle prime determinazioni messe a punto nel laboratorio clinico ed è anche uno degli esami che ha subito nel tempo modifiche rilevanti della procedura analitica. Tuttavia, nonostante gli sforzi per migliorare le prestazioni analitiche dei metodi, a tutt'oggi l'esame presenta diverse criticità, tra cui: una scarsa standardizzazione; la mancanza di un metodo definitivo impiegabile nella pratica routinaria; la difficoltà di ottenere determinazioni quantitative affidabili e ripetibili, soprattutto perché strettamente dipendenti da una misura accurata della concentrazione della proteinuria totale.

Il presente documento ha lo scopo di descrivere lo stato dell'arte e di aggiornare le raccomandazioni già disponibili (10,11) sulle corrette procedure da applicare nelle fasi pre-, post- e analitica, tenuto conto dell'importanza clinica del risultato e della necessità di armonizzare l'uso di questo esame con quello degli altri disponibili per la gestione del paziente affetto da DP. Il ruolo del laboratorio si rivela quindi cruciale quale parte integrante del processo decisionale clinico (13).

APPROPRIATEZZA DELLA RICHIESTA

Il miglioramento continuo dell'appropriatezza della richiesta è fortemente raccomandato allo scopo di permettere al laboratorio di usare metodi ad elevata affidabilità in popolazioni di pazienti selezionate, evitando l'uso di metodi meno costosi ma meno sensibili proposti dal mercato per risparmiare risorse economiche e carico di lavoro. La richiesta appropriata e il mantenimento di una sensibilità diagnostica elevata sono fondamentali per non perdere pazienti con malattie che possono essere rapidamente fatali se non trattate tempestivamente.

La presenza della PBJ si riscontra in diverse malattie immunoproliferative, tra cui le più frequenti sono:
- Gammopatie monoclonali di incerto significato (MGUS)
- Gammopatie monoclonali di significato clinico (MGCS) (14,15)
- Mieloma asintomatico o smoldering (SMM)
- Mieloma multiplo (MM)
- Macroglobulinemia di Waldenström (MW)
- Amiloidosi AL
- Malattia da deposito di catene leggere (LCDD)

La PBJ si può osservare più raramente anche in altre patologie linfoproliferative (15-17), tra cui alcuni linfomi e nelle leucemie linfatiche croniche.

La ricerca della PBJ è particolarmente rilevante nelle malattie da piccoli cloni, come l'amiloidosi AL e la LCDD;

Tabella 1
Indicazione per la ricerca e per la quantificazione della proteina di Bence Jones.

Condizioni	Ricerca	Quantificazione	Bibliografia rilevante
Riscontro occasionale di una CM	SI*		GdS Proteine SIBioC 2008 (27)
MGUS	SI*		IMWG 2009 (3)
SMM	SI	SI	IMWG 2014 (28)
MM (diagnosi e monitoraggio)	SI	SI	IMWG 2014 (28)
Ipogammaglobulinemia non attesa nell'adulto	SI		GdS Proteine SIBioC (27)
Sospetto clinico di malattie "da piccolo clone" (amiloidosi AL, LCDD, ecc.) diagnosi e monitoraggio	SI		IMWG 2009 (3) Raccomandazioni australiane (7)
Macroglobulinemia di Waldenström	SI**		(21-25)
Idoneità all'impiego del mezzo di contrasto	NO		Documento di consenso SIRM – SIBioC (26)

**È preferibile la quantificazione delle catene leggere libere circolanti. La ricerca della proteinuria di Bence Jones in questo caso è raccomandata solo nei laboratori che non eseguono la determinazione delle catene leggere libere plasmatiche (3,16,29).*
*** Non esiste in letteratura consenso unanime.*
CM, componente monoclonale; MGUS, gammopatia monoclonale di incerto significato; SMM, mieloma asintomatico o smoldering; MM, mieloma multiplo; LCDD, malattia da deposito di catene leggere; GdS, gruppo di studio;; IMWG, International Myeloma Working Group; SIRM, Società Italiana di Radiologia Medica.

la sua aggiunta agli esami diagnostici di base, ne aumenta in modo significativo la sensibilità diagnostica (16-20).

La determinazione della PBJ è essenziale nella fase di diagnosi e inquadramento clinico delle DP, nella verifica dell'efficacia terapeutica e del tipo di risposta alla terapia e in tutte le fasi del percorso assistenziale dell'amiloidosi AL. La quantificazione è importante nella definizione della diagnosi di SMM e nella valutazione della risposta alla terapia nel MM. Per quanto riguarda la MW, non esiste in letteratura un accordo unanime circa l'utilità della determinazione della PBJ, sia per la diagnosi che per il monitoraggio della patologia (21-25). In mancanza di un consenso chiaro ed esplicito, vale la prassi locale, secondo le regole della buona pratica assistenziale. Sulla scorta del documento congiunto della Società Italiana di Radiologia Medica (SIRM) e SIBioC (26) la ricerca della PBJ non è indicata nella valutazione del rischio renale per i pazienti da sottoporre a indagine radiologica con mezzo di contrasto.

Le condizioni nelle quali è appropriato richiedere la ricerca della proteinuria di Bence Jones sono elencate nella Tabella 1. È importante che il laboratorio promuova un costante dialogo con gli specialisti ematologi, al fine di evitare una richiesta inappropriata.

INDICAZIONI PER IL LABORATORIO

Fase pre-analitica

Il tipo di campione raccolto, l'eventuale necessità di un suo pre-trattamento (30) e la misurazione delle proteine totali urinarie (31) rappresentano elementi di criticità nella standardizzazione del processo preanalitico con ricadute da non sottovalutare sulla determinazione quantitativa della PBJ.

Prima dell'analisi chimica e immunochimica, per ridurre le interferenze preanalitiche e analitiche dovute a cristalli, batteri, cellule, muco ed altri materiali in sospensione, è opportuno sottoporre i campioni di urina a centrifugazione da 1000 a 2000 g per 5-10 minuti (32,33).

Tipo di campione

Occorre precisare che le recenti linee guida Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) (34) sulla malattia renale cronica e sulla malattia renale acuta raccomandano il campione di urina della prima minzione del mattino per la determinazione dell'albuminuria e della proteinuria totale, esprimendo il risultato in rapporto all'escrezione urinaria di creatinina. Al contrario, i documenti di consenso e le linee guida più rappresentativi dell'IMWG (2,28,35,36) raccomandano la raccolta delle 24 ore per la quantificazione della PBJ, in particolare nella determinazione della risposta alla terapia. Appare quindi ragionevole l'uso del campione della prima minzione del mattino per la ricerca e raccomandabile l'uso del campione della raccolta delle 24 ore per la quantificazione, avendo cura di mantenere l'urina refrigerata durante la fase di raccolta fino all'arrivo in laboratorio per evitare la degradazione batterica della proteina.

Indicazione I. Tipo di campione
- Ricerca: prima minzione del mattino *- Quantificazione: campione delle 24 ore*

Concentrazione delle urine

Nell'ambito della ricerca della PBJ, la concentrazione del campione urinario è suggerita quando non è possibile, con i metodi a disposizione, raggiungere il limite raccomandato di sensibilità di 10 mg/L (7,10,11) e quando, a fronte di un preciso sospetto diagnostico, anche l'immunofissazione può non essere in grado di rilevare la presenza di PBJ su campione nativo.

Non è descritto in letteratura un metodo unico per concentrare le urine al fine della determinazione della PBJ. Alcuni Autori indicano di concentrare le urine a partire da un fattore 10 (10x) fino a un fattore 200 (200x) (7,37–41), mentre altri suggeriscono di valutare preventivamente la concentrazione delle proteine totali urinarie per poi usare un fattore di concentrazione variabile al variare della proteinuria (16,37,39).

Poiché la massa molecolare della PBJ oscilla intorno ai 22 KDa, il dispositivo per concentrare le urine deve essere in grado di trattenere le proteine con massa molecolare intorno a 10 kDa (7,10,11,38). I metodi di concentrazione centrifughi, dotati di membrane porose, dialitiche o desalificanti, consentono di ottenere buoni risultati, rispettando il più possibile la natura della proteina (11,42). È da notare peraltro che qualsiasi modalità di concentrazione può portare alla perdita di materiale in modo non lineare. In particolare, sono da evitare i metodi di concentrazione per adsorbimento (43) che non garantiscono l'integrità delle catene polipeptidiche. È importante evidenziare che i metodi di desalificazione del campione non comportano necessariamente la sua concentrazione.

Indicazione II. Concentrazione delle urine
- Il dispositivo deve trattenere molecole di 10 kDa (circa) *- Evitare i metodi per adsorbimento* *- Qualsiasi metodo può comportare perdita di materiale*

Determinazione della proteinuria totale

I metodi per la determinazione delle proteine totali urinarie rappresentano una criticità nel laboratorio clinico, perché sono inaccurati, non riferibili, affetti da interferenze e scarsamente ripetibili, soprattutto a causa del contenuto eterogeneo e altamente variabile di proteine e polipeptidi nelle urine. Inoltre, come noto, la proteinuria può variare considerevolmente in base allo stato d'idratazione del soggetto. Tra i vari metodi

disponibili, i più usati nella pratica di laboratorio sono quelli colorimetrici (pirogallolo rosso molibdato, pirocatecolo violetto molibdato, blu di Coomassie). Non pochi laboratori usano tuttavia metodi turbidimetrici o nefelometrici basati sulla reazione delle proteine nel campione di urina con reagenti chimici, come il benzetonio cloruro o l'acido tricloroacetico. Purtroppo, tutti i metodi commerciali attualmente disponibili impiegano reagenti che posseggono affinità di legame diverse per le varie proteine urinarie; ciò comporta un grado di inaccuratezza delle misure che varia al variare della composizione proteica presente nel campione. L'albumina è la proteina che possiede la maggiore affinità di legame con i vari coloranti; al contrario, la PBJ possiede una bassa affinità di legame e per tale motivo proteinurie anche cospicue caratterizzate da prevalente presenza di PBJ possono essere sottostimate (7). Inoltre, l'elevata eterogeneità molecolare intra- e inter-individuale della PBJ può dare origine ad un legame non lineare con il reagente, causando la perdita di accuratezza della misura che, a sua volta, si ripercuote sulla quantificazione densitometrica della PBJ (7,11, 44–46). I metodi in chimica secca (strisce reattive) sono diffusissimi per la loro semplicità e facilità interpretativa; si tratta di determinazioni semi-quantitative basate su una scala di colore e potenzialmente affette da interferenze dovute alla presenza di cataboliti occasionalmente presenti nell'urina e derivanti da farmaci o da cibi assunti prima dell'esame. La limitazione più rilevante di questi metodi è che raramente sono in grado di svelare la presenza di proteinuria costituita quasi esclusivamente dalla PBJ. Per questi motivi, si sconsiglia l'uso di metodi in chimica secca per la quantificazione delle proteine totali urinarie (11,47,48).

Indicazione III. Proteine totali urinarie

- Si sconsiglia l'utilizzo delle strisce reattive (insensibili alla presenza della proteina di Bence Jones

Fase analitica

Analisi qualitativa- Ricerca della proteina

L'analisi qualitativa è il primo approccio di laboratorio alla ricerca della PBJ e deve basarsi esclusivamente su metodi in grado di caratterizzare la morfologia monoclonale delle CLL nell'urina. Inoltre, deve basarsi su metodi combinati (elettroforesi e immunoprecipitazione) in grado di riconoscere il tipo di CLL monoclonale (κ o λ), differenziando le catene leggere monoclonali legate (immunoglobuline complete o parti) dalle CLL monoclonali libere. Ne consegue che nessun metodo all'infuori di quelli separativi in elettroforesi è in grado al momento di evidenziare la peculiarità della morfologia (monoclonale o policlonale) di CLL nell'urina. Recentemente sono stati proposti metodi ottimizzati in spettrometria di massa in grado di soddisfare questi criteri (49).

L'immunofissazione urinaria (uIFE) è considerata a tutt'oggi il metodo di riferimento per la ricerca della PBJ, consentendo di soddisfare i requisiti su esposti (36).

Esami di primo livello. L'esame ideale dovrebbe essere un esame immunoelettroforetico (su supporto solido o in capillare), su campione nativo che consenta il riconoscimento di una CM urinaria, dotato di un'elevata sensibilità (≤10 mg/L), semplice, rapido, poco costoso e, soprattutto, in grado di minimizzare i falsi negativi. Questo metodo purtroppo ancora non esiste, ma il mercato ha proposto vari metodi rapidi che tuttavia non sono esenti da criticità.

In letteratura sono stati descritti metodi di immunofissazione rapida da utilizzarsi come esame di primo livello che impiegano miscele di antisieri anti-κ e λ totali (talora in aggiunta anche antisieri anti IgG, IgA, IgM, anti-albumina e anti-alfa1 microglobulina) cimentati su un'unica corsia (40,50,51). Questi metodi consentirebbero di evidenziare i campioni negativi sottoponendo alla conferma in immunofissazione classica i campioni dubbi o positivi. I dati relativi presenti in letteratura sono ancora da considerarsi preliminari e necessitano di convalida su ampie casistiche e in popolazioni selezionate. Per tali motivi, non si ritiene che questi metodi possano sostituire l'uIFE classica su gel d'agarosio, né si ritiene che essi siano del tutto privi di possibilità di risultati falsi negativi, alla luce delle esperienze finora pubblicate. Tuttavia, nei pazienti in monitoraggio e con PBJ già nota al laboratorio, nel caso in cui l'esame di primo livello evidenzi una CM, si può ritenere confermata la PBJ diagnosticata in precedenza, a meno di mutate condizioni che inducano ad eseguire approfondimenti.

Immunofissazione urinaria (uIFE). È la tecnica raccomandata (3,5–7,10,11,35,36,38) per la ricerca e la diagnosi di PBJ e consente di rilevare la presenza di CLL monoclonali nelle urine, di caratterizzarle come κ o λ e di verificare contestualmente l'eventuale presenza di una Ig completa. È opportuno che ogni laboratorio raggiunga la sensibilità raccomandata, utilizzando, se necessario, tecniche di concentrazione del campione o sistemi di colorazione altamente sensibili come i coloranti colloidali (10,11,37,42,52). I più comuni kit per immunofissazione in commercio, secondo quanto dichiarato dai produttori, raggiungono la sensibilità richiesta senza necessità di concentrare il campione quando si utilizzino antisieri anti κ o anti λ totali. È comunque opportuno che ogni laboratorio verifichi la sensibilità analitica del metodo in uso, nel contesto della propria operatività.

Il campione di urina è deposto nel gel su tre corsie e cimentato con antisieri anti-GAM (miscela anti-IgG, IgA e IgM) e anti-κ e anti-λ totali. Gli antisieri anti catena leggera libera sono più costosi e meno sensibili a causa della loro scarsa avidità per l'antigene (7,10,11). La PBJ è presente nel campione analizzato quando si verifica la reazione con gli antisieri come rappresentato in Figura 1.

Qualora nel siero del paziente sia rilevata una CM con catene pesanti di tipo IgD o IgE, occorre inserire

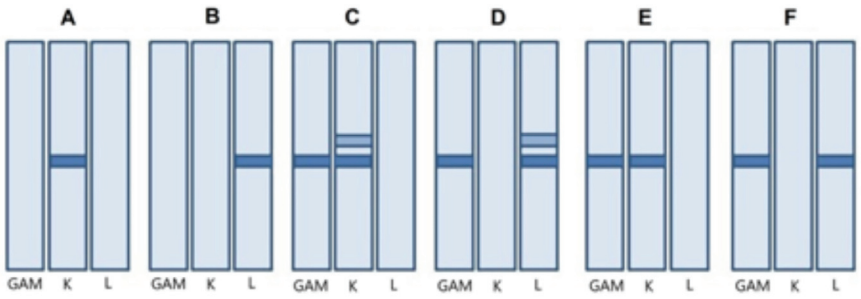

Figura 1. *Immunofissazione su gel di agarosio per la determinazione della proteina di Bence Jones (PBJ)*

Nella figura è schematizzata una immunofissazione urinaria su gel di agarosio a 3 corsie. Gli antisieri utilizzati sono anti-GAM (IgG, IgA, IgM), anti-catene κ e anti-catene λ totali. Sono raffigurate le diverse combinazioni in cui si può presentare una componente monoclonale nelle urine. A, campione positivo per PBJ tipo κ; B, campione positivo per PBJ tipo λ; C, campione positivo per PBJ tipo κ + Igκ; D, campione positivo per >PBJ tipo λ + Ig-λ; E, Ig-κ (da verificare se si è in presenza di una PBJ-κ comigrante con una Ig-κ); F, Ig-λ (da verificare se si è in presenza di una PBJ-λ comigrante con una Ig-λ).

questi antisieri anche nel pannello dell'uIFE corrispondente (7)

Indicazione IV. Ricerca della proteina di Bence

- *L'immunofissazione urinaria è la tecnica di elezione*
- *Gli esami di I livello sono da utilizzare con estrema cautela*

Analisi quantitativa – Quantificazione della proteina

La determinazione quantitativa della PBJ pone numerosi problemi sia di natura strettamente analitica (non esiste alcun sistema analitico in grado di garantire una misura accurata della PBJ) sia di natura procedurale, in quanto questa determinazione non può prescindere dalla valutazione della proteinuria totale e dall'influenza di altre proteine urinarie come l'albumina. Tuttavia, la conoscenza del valore quantitativo di PBJ è un indice che possiede un valore clinico e pertanto il laboratorio deve porre molta attenzione nel cercare di ridurre i vari fattori che concorrono all'imprecisione del metodo, non potendone modificare l'inaccuratezza. La determinazione quantitativa rimane tuttavia un dato di laboratorio aggiuntivo e non sostituisce l'iter diagnostico costituito dall'identificazione elettroforetica di un picco monoclonale e dalla caratterizzazione all'uIFE del tipo di CLL monoclonale. In un algoritmo ideale, la quantificazione deve sempre essere preceduta da un riscontro qualitativo positivo (Figura 2).

Le principali raccomandazioni indicano la misura quantitativa nel campione di urina delle 24 ore (3,5–7,10,11,35,36,38); nel caso in cui non si disponga della raccolta delle 24 ore, la concentrazione di PBJ va rapportata alla creatinina urinaria (7,11,53). In quest'ultimo caso è raccomandata la prima minzione del mattino. Campioni estemporanei prelevati nell'arco della giornata, possono dar luogo a risultati fuorvianti a causa dell'influenza di svariati e numerosi fattori che incidono

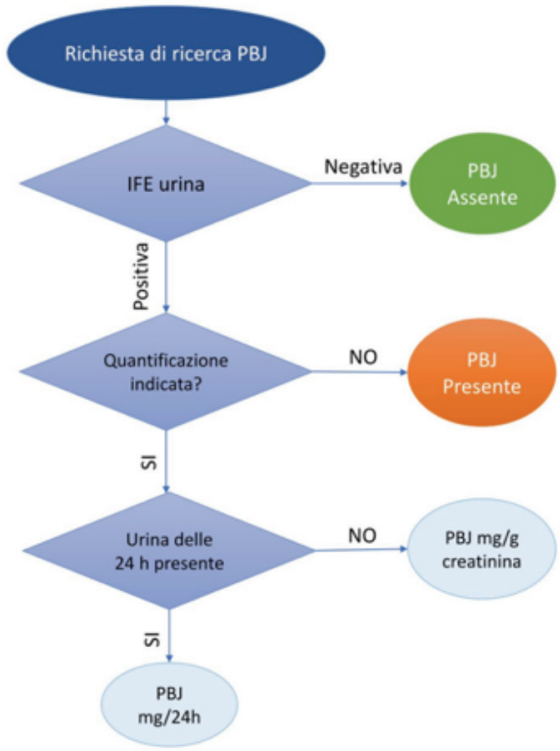

Figura 2. *Algoritmo per la determinazione della proteina di Bence Jones.*
IFE, immunofissazione; PBJ, Proteina di Bence Jones.

sul volume urinario e sulla concentrazione di soluti urinari, quali la temperatura esterna, l'attività fisica, il carico idrico, episodi febbrili, stress, e così via.

L'IMWG definisce il criterio di "misurabilità della malattia" quando è soddisfatto almeno uno dei seguenti requisiti: CM sierica superiore a 10 g/L, CLL coinvolta superiore a 100 mg/L in presenza di rapporto delle CLL circolanti alterato e PBJ superiore a 200 mg/24h (2). Se

Ellidag et al. (46) suggeriscono che ogni laboratorio determini il proprio limite di sensibilità, Tate et al. (7) individuano in 200 mg/L di proteine totali urinarie il limite al di sotto del quale la misurazione di PBJ risulta essere non sufficientemente accurata. D'altra parte, nei criteri di valutazione della terapia raccomandati dall'IMWG (35) è indicato nella risposta parziale molto buona (VGPR) che la PBJ sia inferiore a 100 mg/24h. Risulta quindi necessario raggiungere almeno questo livello di sensibilità.

Quantificazione densitometrica. È il metodo raccomandato (3,5–7,10,11,35,36,38). Si basa sulla valutazione dell'entità del picco monoclonale rilevato all'elettroforesi dell'urina (uELF), rapportata in percentuale alla quantità di proteine totali urinarie. Come già ricordato la misurazione delle proteine urinarie totali rappresenta una delle criticità di questa determinazione.

Sul campione di urine delle 24 ore, previa concentrazione se necessario, viene eseguita una uELF su gel di agarosio ad alta sensibilità, (High Resolution Agarose Gel Electrophoresis – HR AGE). Il colorante solitamente utilizzato è il violetto acido, o il blu di Coomassie; con questi coloranti la sensibilità del metodo può arrivare a 20-50 mg/L (54).

Il tracciato elettroforetico è poi sottoposto a scansione densitometrica. Il picco monoclonale individuato viene quindi delimitato e, tramite apposito software, viene calcolata in percentuale l'area sottesa che, moltiplicata per la concentrazione delle proteine totali sulle urine delle 24 ore, consente di ricavare la quantità di PBJ espressa in mg/24h (31,55). In alternativa, sulle urine del mattino, la concentrazione ricavata deve essere espressa in rapporto alla creatinina urinaria (7,11,53). Sono descritte due modalità per delimitare il picco monoclonale:

- Perpendicular Drop (PD), tecnica che integra l'area del picco delimitandola da due linee ortogonali tracciate dai punti di flesso alla linea base del grafico
- Tangent Skimming (TS), tecnica che integra l'area del picco delimitandola con una linea tangente tra i due punti di flesso.

Ognuno dei due metodi presenta vantaggi e svantaggi e non è possibile raccomandarne uno in particolare perché la loro accuratezza dipende dalla entità del picco monoclonale che si sta quantificando e dalla entità del fondo policlonale nel quale la CM stessa è inserita, nonché dalla possibile co-migrazione (o vicinanza) della CM con altre proteine fisiologicamente presenti (56,57). L'indicazione è comunque quella di eseguire la quantificazione di un campione sempre con lo stesso metodo, adottando all'interno del laboratorio regole precise e condivise per la delimitazione del picco.

Le varie frazioni proteiche separate in HR-AGE hanno una diversa affinità per il colorante (42), quindi, a parità di concentrazione, possono assumere densità ottiche differenti. Per valori elevati di proteinuria, infatti, non è lineare il rapporto tra la concentrazione delle proteine e l'intensità del picco a causa della saturazione dei siti di legame con le proteine del colorante e per l'intrinseca ridotta linearità della tecnica densitometrica (42,57,58).

La struttura molecolare della PBJ è eterogenea e può causare una risposta non proporzionale alla sua concentrazione e con la possibilità di riscontrare picchi sdoppiati per i diversi gradi di polimerizzazione della molecola, rendendone così difficile la misurazione. Si può inoltre verificare una co-migrazione con una Ig completa, nel qual caso è impossibile distinguere le due entità. Per esempio, se la PBJ migra in zona beta1, potrebbe sovrapporsi alla transferrina, quando presente. Nel caso di concentrazioni elevate di PBJ, tale eventualità incide relativamente poco sulla valutazione quantitativa; al contrario, per basse concentrazioni di PBJ migrante in zona beta-1 associate alla presenza di transferrina, la misura quantitativa diventa ancor più inaccurata. Nei casi in cui una piccola PBJ migri in zona beta-1, sarebbe auspicabile valutare la quantità di transferrina con un metodo immunochimico. Infine, la presenza di proteinuria mista in campioni con concentrazioni elevate di proteine totali urinarie rende difficile la misura della PBJ perché in questi casi le Ig policlonali ed altre proteine si sovrappongono, aumentando la linea di base del tracciato elettroforetico e amplificando quindi il "rumore di fondo" che rende problematica l'individuazione e la misurazione del picco PBJ (31).

L'esecuzione dell'uELF, necessaria per la quantificazione della PBJ, consente di evidenziare anche il tipo di proteine presenti nel campione, offrendo l'opportunità di indicare al curante un'eventuale proteinuria glomerulare, tubulare o mista per una valutazione della funzionalità renale del paziente (7).

Nonostante il mercato stia proponendo sistemi in automazione sia per l'uELF che per la lettura densitometrica delle frazioni proteiche urinarie (59), a tutt'oggi la separazione elettroforetica delle proteine urinarie, sia con tecniche su supporto solido che in capillare, rimane un esame che richiede ancora una componente di manualità; ciò implica tempi analitici relativamente lunghi e necessità di risorse umane dedicate.

Quantificazione in elettroforesi capillare zonale. Attualmente, non è ancora messo a punto un sistema affidabile in elettroforesi capillare zonale (CZE) per l'uELF e l'immunotipizzazione della PBJ. Esistono modifiche del metodo per la CZE sierica, ma gli ostacoli principali sono di due tipi: la difficoltà di analizzare campioni con basse concentrazioni di proteine e la presenza di molte sostanze non proteiche che interferiscono nella qualità e nella risoluzione della separazione elettroforetica. Questi problemi non sono stati finora completamente risolti dall'impiego di metodi di pre-trattamento del campione urinario, ed anzi questi metodi, finalizzati per lo più alla sola rimozione (quasi sempre parziale) di sali, sono molto lunghi, complessi e costosi (60). Tuttavia, il metodo CZE può essere usato solo dopo pre-trattamento del campione.

La sensibilità del metodo, teoricamente superiore a quella del metodo densitometrico, è intorno ai 7-12 mg/L

per campioni con concentrazione di proteine totali urinarie ≥100 mg/L; al di sotto di questo valore l'elettroferogramma può non essere interpretabile (60,61). Fino a quando il mercato non renderà disponibile un sistema in completa automazione capace di integrare la fase preparativa con quella analitica per ottenere tracciati ad elevata risoluzione separativa e raggiungere sensibilità analitiche intorno ai 10 mg/L per la PBJ, il metodo in CZE risulterà non ottimale nell'applicazione in laboratorio, soprattutto per la caratterizzazione immunotipica della PBJ.

Quantificazione immunochimica. È opportuno premettere che la determinazione immunonefelometrica o immunoturbidimetrica delle catene leggere totali (cioè legate + libere) urinarie, così come è riconosciuto per le catene leggere totali sieriche, fornisce un dato non adeguato al monitoraggio della DP. L'impiego degli antisieri anti catene leggere totali, non consente infatti di distinguere analiticamente le catene leggere legate all'Ig, dalle libere (62,63). Gli antisieri anti CLL legano selettivamente le CLL urinarie sia mono che policlonali. Questa misura tuttavia è ampiamente sconsigliata in letteratura da vari Autori (3,5,7,10,11,54) a causa appunto dell'impossibilità dei metodi immunochimici di distinguere le CLL monoclonali dalle policlonali. Ciò può provocare una sovrastima della concentrazione di CLL urinarie (7,64). Molte altre sono peraltro le problematiche riscontrabili nella determinazione delle CLL con metodi immunochimici. Anzitutto, ogni clone plasmacellulare iper-secernente produce un'immunoglobulina atipica e unica, che si differenzia nella sua struttura primaria e secondaria dalle immunoglobuline normalmente secrete dalle plasmacellule; conseguentemente, le CLL monoclonali sono diverse da paziente a paziente. Inoltre, i calibratori e i controlli possono essere policlonali pur dovendo misurare nel campione CLL monoclonali. Laddove anche si usino reagenti monoclonali, rimane la mancanza di un calibratore standard internazionale a cui riferirsi e permane comunque la mancanza di parallelismo tra calibratore e misurando (65-69). Esiste poi una discreta variabilità tra lotti; non c'è confrontabilità tra metodi che utilizzano anticorpi monoclonali e policlonali (67), ed infine, l'insidia maggiore è rappresentata dall'effetto prozona che si verifica quando, in condizione di eccesso di antigene, l'immunocomplesso si discioglie producendo un dato falsamente negativo (64). I più recenti analizzatori - turbidimetri o nefelometri - tuttavia, sono in grado di rilevare l'effetto prozona con tecniche in automazione grazie al collegamento con software in grado di riconoscere e gestire l'eccesso di antigene applicando al campione diluizioni seriali fino al conseguimento di un dato conforme alla diluizione applicata (70-72). Pur essendo tali strumenti affidabili, è sempre necessario che l'operatore controlli la coerenza del dato ottenuto con la storia del paziente ed eventualmente proceda con diluizioni di conferma.

La misurazione delle CLL non fornisce propriamente un'indicazione sulla concentrazione della PBJ, in quanto sono contemporaneamente rilevate anche le CLL policlonali. Qualora si ritenga di procedere con tale misurazione, questa deve sempre associata ad una preliminare uIFE, che confermi la presenza di CLL monoclonali. In questo caso, la contestuale misura immunometrica delle CLL urinarie può rappresentare un supporto nel monitoraggio della risposta alla terapia, a patto che la funzione renale del paziente sia conservata (73-76). Infatti, nel caso di proteinuria mista o comunque di alterata permeabilità glomerulare, le CLL policlonali sono tra le prime proteine a passare nell'urina, influenzando il risultato della determinazione immunometrica delle CLL.

La valutazione quantitativa immunochimica delle CLL presenta alcune proprietà significative: un'elevata sensibilità (<1 mg/L) (73,77), un ampio intervallo di misura, sia per il limite inferiore che superiore di linearità, la possibilità di usare campioni nativi (urine non concentrate) ed infine l'assenza di interferenze da eventuale presenza di Ig complete o altre proteine sul risultato (78).

Il diverso catabolismo delle CLL κ e λ, specialmente in soggetti affetti da nefropatia, così come un'eventuale biclonalità κ e λ (78), potrebbero provocare una falsa alterazione o una falsa normalizzazione del rapporto κ/λ delle CLL (54). Per tale motivo alcuni Autori (73-76) suggeriscono di non calcolare il rapporto κ/λ delle CLL urinarie, esprimendo il dato in mg/24h o in riferimento alla creatinina urinaria (mg/g creatinina). Alla luce delle evidenze sopra riportate, il rapporto κ/λ nell'urina può essere fuorviante e pertanto si raccomanda di non eseguire tale calcolo e di non riportare il dato nel referto, anche nei casi in cui il rapporto κ/λ sia calcolato automaticamente dallo strumento analitico.

La misurazione delle CLL nelle urine del mattino, d'altro canto, evita le criticità derivanti dalla concentrazione del campione, dalla misura delle proteine totali urinarie e dalla raccolta delle 24 ore.

Indicazione V. Quantificazione della proteina di Bence Jones

- *La quantificazione densitometrica è la tecnica racco mandata*
- *La quantificazione in elettroforesi capillare zonale non è ancora consolidata*
- *La quantificazione immunochimica può essere utilizzata se preceduta da una immunofissazione di conferma della positività per proteina di Bence Jones; può essere vantaggiosamente utilizzata per monitoraggio*
- *Non calcolare e non riportare nel referto il rapporto κ/λ delle CLL*

Fase post-analitica

Nell'ambito delle DP esistono molte linee guida, raccomandazioni e documenti di consenso, nazionali ed internazionali, relativi agli aspetti metodologici, diagnostici, di valutazione della stadiazione, del

monitoraggio e del trattamento terapeutico, mentre poco appare in letteratura circa le modalità di refertazione dei parametri analizzati, pur essendo l'interpretazione dei risultati parte integrante delle attività del laboratorio. Come evidenziato da alcune indagini conoscitive (79), esistono notevoli difformità tra le modalità operative e di refertazione adottate nei vari laboratori e spesso si riscontrano sostanziali differenze nel contenuto e nella struttura dei referti prodotti. È auspicabile che si faccia ogni sforzo per armonizzare il referto di laboratorio, per rendere più facile il confronto tra strutture diverse. Infatti eventuali difformità possono dare origine ad errori interpretativi da parte dei clinici curanti (79,80). In tale scenario, alcuni autori Canadesi hanno proposto, sia per l'elettroforesi che per l'immunofissazione sierica e urinaria, dei referti "sinottici" di più facile interpretazione (81).

Il referto

Il referto deve contenere dati chiari, facilmente fruibili dal clinico e accompagnati da brevi commenti interpretativi. È fortemente auspicabile una standardizzazione dei commenti interpretativi al fine di armonizzare il referto con quello di altri laboratori. Come per altri esami di laboratorio, al nome dell'esame deve essere associato il metodo (ad esempio: elettroforesi urinaria, metodo in gel d'agarosio ad elevata risoluzione). Il referto non deve contenere dati ridondanti, che possono fuorviare il messaggio finale e, se del caso, deve fare riferimento ad eventuali esami aggiunti dal laboratorio (esami riflessi).
Il referto dovrà includere le seguenti informazioni:
Se si tratta di analisi qualitativa, finalizzata a verificare la presenza o l'assenza della PBJ, l'intestazione del referto sarà:

RICERCA DELLA PROTEINA DI BENCE JONES
Riportare nel referto:
- la tipologia di campione impiegato (prima minzione del mattino)
- il metodo impiegato (immunofissazione su gel di agarosio) e la sua sensibilità espressa in mg/L ed eventuale concentrazione del campione

Risultato (esempi):
- Positiva, catene leggere libere monoclonali di tipo k (o λ)
- Negativa, assenza di catene leggere libere monoclonali
- Positiva, catene leggere libere monoclonali di tipo k (o λ). Si segnala la presenza di una componente monoclonale IgX (k o λ)
- Negativa, assenza di catene leggere libere monoclonali. Si segnala la presenza di una componente monoclonale CM IgX (k o λ)
- Positiva per catene leggere libere monoclonali di tipo k e positiva per catene leggere libere monoclonali di tipo λ.

Se si tratta di analisi quantitativa finalizzata alla misura della PBJ (eseguita solo se clinicamente indicato e dopo l'analisi qualitativa), l'intestazione del referto sarà.

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLA PROTEINA DI BENCE JONES
Riportare nel referto:
- Tipologia di campione (ad esempio: urine delle 24 ore)
- Diuresi (mL/24h)
- Misura della concentrazione delle proteine totali urinarie (mg/L) con relativo metodo
- Metodo analitico (ad esempio scansione densitometrica)
- Risultato della misura (ad esempio xxx mg/24h)

Quando la PBJ, pur rilevata con l'analisi qualitativa, è in quantità così esigua da non essere misurabile, va segnalata come presente ma inferiore al limite di sensibilità quantitativo stabilito dal laboratorio.

Esempi di referto sono riportati in appendice.

Commento interpretativo

Il supporto dei documenti di consenso è indispensabile per raggiungere auspicati livelli di armonizzazione che permettano di uniformare il più possibile i risultati e i commenti interpretativi ad essi associati. I commenti devono essere chiari, concisi, rilevanti e non ambigui.
Da evitare commenti che diano adito a fraintendimenti, come ad esempio:
Sospetta proteinuria di Bence Jones
Catene leggere libere urinarie di non chiara natura monoclonale
Probabile CM urinaria in attesa di tipizzazione
oppure segnalare la PBJ negativa quando inferiore ad una certa concentrazione espressa in mg/L, creando disorientamento circa la presenza/assenza della PBJ stessa (82).
Solo in casi particolari e in situazioni inaspettate, il commento va generato al momento ed il laboratorista deve essere in grado di fornire un commento inedito e specifico per la specifica situazione riscontrata (80,81,83).

Indicazione VI. Refertazione

Il referto deve contenere:
- il tipo di indagine (qualitativa o quantitativa)
- il metodo usato e la sua sensibilità
- il risultato (descrittivo se si tratta della ricerca; numerico se si tratta di quantificazione)
- le unità di misura (se si tratta di quantificazione)
- evitare commenti ambigui

CONCLUSIONI

La determinazione della PBJ è a tutt'oggi un esame di laboratorio di rilevante importanza clinica, sia nella gestione di alcune DP, come l'amiloidosi AL, la malattia da deposito di catene leggere e il mieloma non secernente, che nella fase di inquadramento clinico delle MGUS e MGCS e nella valutazione della risposta al trattamento terapeutico del mieloma multiplo. Negli ultimi 15-20 anni la determinazione della PBJ non ha subito sostanziali cambiamenti metodologici e gran parte delle raccomandazioni pubblicate in precedenza (10,11) sono tutt'ora valide e ribadite nel presente documento.

Gli elementi innovativi di questa raccomandazione possono essere riassunti in due aspetti peculiari: definire le caratteristiche e i limiti di nuove metodiche disponibili sul mercato, fornendo indicazioni sul loro eventuale uso da parte del laboratorio e definire gli strumenti per avviare il processo di armonizzazione delle fasi pre-analitica, analitica e post-analitica con particolare attenzione alla refertazione. Per quanto riguarda il primo aspetto, il gruppo di lavoro che ha sottoscritto questo documento richiama l'esigenza di basare le scelte metodologiche sulle caratteristiche qualitative del metodo e sulle evidenze della letteratura, privilegiando l'affidabilità analitica rispetto all'efficienza organizzativa, che è importante ma non vincolante. Altrettanto importante è l'indicazione su quando usare questi metodi, sui loro limiti e su come interpretare i loro risultati. Il secondo aspetto richiama l'esigenza di condividere algoritmi analitici tra laboratori e armonizzare l'espressione dei referti che, pur nella diversità, dovrebbero basarsi su una struttura comune e su commenti interpretativi codificati, al fine di trasmettere ai colleghi clinici e ai medici curanti informazioni chiare, semplici e il più possibile omogenee tra i vari laboratori (83-85). Questa sfida rappresenta l'elemento chiave per mantenere sempre aperta l'interfaccia con il medico curante e gli specialisti, includendo di fatto il laboratorio nel percorso assistenziale del paziente con DP. L'armonizzazione della diagnostica di laboratorio delle DP è anche un punto di aggregazione nell'acquisizione di diagnostici attraverso gare regionali o di area vasta, perché consente di dare forza e credibilità alla rete locale dei laboratori. È auspicabile che metodi emergenti, come la spettrometria di massa, entrino nella pratica routinaria, risolvendo problematiche ancora aperte come ad esempio la misura quantitativa della PBJ; tuttavia, sarà necessario ancora del tempo prima che metodi usati sperimentalmente come la spettrometria di massa possano essere alla portata di tutti i laboratori nella diagnostica delle DP. Pertanto, l'opportunità attuale consiste nell'usare al meglio gli strumenti a disposizione, azzerando, se possibile, il rischio di risultati falsi negativi e falsi positivi e offrendo la visione di un laboratorio clinico teso alla qualità e alla razionalizzazione delle risorse e dei consumi.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders. Br J Haematol 2003;121:749–57.
2. Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. Leukemia 2006;20:1467–73.
3. 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. Leukemia2009;23:215–24.
4. Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, et al. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. Clin Chem 2002;48:1437–44.
5. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: Report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. Blood 2011;117:4701–5.
6. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B, et al. Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: Report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. Blood 2011;117:4691–5.
7. Tate J, Caldwell G, Daly J, et al. Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. Ann Clin Biochem 2012;49:242–56.
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.
9. Beetham R, Wassell J, Wallage MJ, et al. Can serum free light chains replace urine electrophoresis in the detection of monoclonal gammopathies? Ann Clin Biochem 2007;44:516–22.
10. Graziani S, Merlini G, Petrini C. Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. Biochim Clin 2001;25:23–32.
11. Graziani M, Merlini G, Petrini C. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. Clin Chem Lab Med 2003;41:338–46.
12. Caldini A, Graziani MS, Basile U, et al. Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali. Biochim Clin 2014;38:47–53.
13. Plebani M. Contenimento dei costi nel laboratorio clinico: razionamento o razionalizzazione? Biochim Clin 2016;40:123–8.
14. Fermand JP, Bridoux F, Dispenzieri A, et al. Monoclonal gammopathy of clinical significance: A novel concept with therapeutic implications. Blood 2018;132:1478–85.
15. Leung N, Barnidge DR, Hutchison CA. Laboratory testing in monoclonal gammopathy of renal significance (MGRS). Clin Chem Lab Med 2016;54:929–37.
16. Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. Clin Chem 2009;55:1517–22.
17. Willrich MAV, Murray DL, Kyle RA. Laboratory testing for monoclonal gammopathies: Focus on monoclonal

gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. Clin Biochem 2018;51:38–47.
18. Sayed RH, Wechalekar AD, Gilbertson JA, et al. Natural history and outcome of light chain deposition disease. Blood 2015;126:2805–10.
19. 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.
20. Mollee P, Merlini G. Free light chain testing for the diagnosis, monitoring and prognostication of AL amyloidosis. Clin Chem Lab Med 2016;54:921–7.
21. Owen RG, Pratt G, Auer RL, et al. Guidelines on the diagnosis and management of Waldenström macroglobulinaemia. Br J Haematol 2014;165:316–33.
22. Castillo JJ, Garcia-Sanz R, Hatjiharissi E, et al. Recommendations for the diagnosis and initial evaluation of patients with Waldenström Macroglobulinemia: A Task Force from the 8th International Workshop on Waldenström Macroglobulinemia. Br J Haematol 2016;175:77–86.
23. Vos JMI, Minnema MC, Wijermans PW, et al. Guideline for diagnosis and treatment of Waldenström's macroglobulinaemia. Netherl J Med 2013;71:54–61.
24. Kastritis E, Leblond V, Dimopoulos MA, et al. Waldenström's macroglobulinaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2018;29:41–50.
25. Gohar Maqbool M, Tam CS, Morison IM, et al. A practical guide to laboratory investigations at diagnosis and follow up in Waldenström macroglobulinaemia: recommendations from the Medical and Scientific Advisory Group, Myeloma Australia, the Pathology Sub-committee of the Lymphoma and Related Disease. Pathology 2020;52:167–78.
26. Mussap M, Graziani MS, Caldini A, et al. Documento di consenso SIBioC e Società Italiana di Radiologia Medica (SIRM) sulla richiesta di esami di laboratorio per la valutazione del danno renale da mezzi di contrasto. Biochim Clin 2014;38:140–2.
27. Graziani M, Dolci A, Greco C, et al. Indicazioni per la richiesta di elettroforesi sieroproteica. Biochim Clin 2008;32:48–51.
28. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol 2014;15:538–48.
29. 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.
30. Lynch C, Lu ZX, Louey W, et al. Urine Bence-Jones protein analysis – to concentrate or not to concentrate. Pathology 2015;47:S84.
31. Siegel DS, McBride L, Bilotti E, et al. Inaccuracies in 24-hour urine testing for monoclonal gammopathies. Lab Med 2009;40:341–4.
32. Fogazzi GB, Garigali G. Collection, preparation and examination of the sample, and report of the urinary finding. Third. Elsevier srl, editor. Fogazzi GB -The urinary sediment. An integrated view. Milano; 2010:19–38 p.
33. Lim K, Steinman TI, Hsiao L-L. Urinalysis. In: Elsevier Inc, editor. Singh AK, Loscalzo J. The Brigham Intensive Review of Internal Medicine E-book. Philadelphia, PA; 2019:678–90.
34. KDIGO 2017 - Clinical Practice Guideline Update For The Diagnosis, Evaluation P an T of CKD-M and BD (CKD-M (CKD-M. Evidence Summary Tables. Kidney International Supplements 2017:7:1-59.
35. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. Lancet Oncol 2016;17:328–46.
36. Ludwig H, Miguel JS, Dimopoulos MA, et al. International Myeloma Working Group recommendations for global myeloma care. Leukemia 2014;28:981–92.
37. Beetham R. Detection of Bence-Jones protein in practice. Ann Clin Biochem 2000;37:563–70.
38. Bird J, Behrens J, Westin J, et al. UK myeloma forum (UKMF) and nordic myeloma study group (NMSG): Guidelines for the investigation of newly detected M-proteins and the management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). Br J Haematol 2009;147:22–42.
39. Roden AC, Lockington KS, Tostrud LJ, et al. Urine protein electrophoresis and immunoelectrophoresis using unconcentrated or minimally concentrated urine samples. Am J Clin Pathol 2008;130:141–5.
40. Jenner W, Klingberg S, Tate JR, et al. Combined light chain immunofixation to detect monoclonal gammopathy: A comparison to standard electrophoresis in serum and urine. Clin Chem Lab Med 2014;52:981–7.
41. Nakano T, Nagata A, Takahashi H. Ratio of urinary free immunoglobulin light chain kappa to lambda in the diagnosis of Bence Jones proteinuria. Clin Chem Lab Med 2004;42:429–34.
42. Mussap M. La ricerca della proteina di Bence Jones tra vecchi problemi e recenti raccomandazioni: considerazioni in margine alle linee guide italiane e americane. Biochim Clin 2002;26:49–54.
43. Lindstedt G, Lundberg P-A. Loss tubular proteinuria pattern during urine concentration with commercial membrane filter cell (Minicon b-15 system). Clin Chim Acta 1974;56:125–6.
44. Maisnar V, Tichy M, Stulik J, et al. The problems of proteinuria measurement in urine with presence of Bence Jones protein. Clin Biochem 2011;44:403–5.
45. Marshall T, Williams KM. Electrophoretic analysis of Bence Jones proteinuria. Electrophoresis 1999;20:1307–24.
46. Ellidag HY, Curek G, Eren E, et al. The cutoff level for urine protein in urine immunofixation electrophoresis. Clin Lab 2015;61:1525–30.
47. Mussap M, Merlini G. Pathogenesis of renal failure in multiple myeloma: Any role of contrast media? Biomed Res Int 2014;2014:1-10.
48. Keren DF, Alexanian R, Goeken J, et al. Guidelines for clinical and laboratory evaluation patients with monoclonal gammopathies. Arch Pathol Lab Med 1999;123:106–7.
49. Milani P, Palladini G. La spettrometria di massa nella diagnosi e nel monitoraggio delle gammopatie monoclonali. Biochim Clin 2019;43:256–63.
50. Basile U, Gulli F, Torti E, et al. Evaluation of screening method for Bence Jones protein analysis. Clin Chem Lab Med 2016;54:331–3.
51. Natali P, De Santis E, Patelli G, et al. A new suggested approach in screening for Bence Jones protein and potential kidney damage. Clin Chem Lab Med 2019;57:54–6.

52. Levinson SS, Keren DF. Free light chains of immunoglobulins: clinical laboratory analysis. Clin Chem 1994;40:1869–78.
53. Bird JM, Owen RG, D'Sa S, et al. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma. Br J Haematol 2011;154:32–75.
54. Le Bricon T. Identification e dosage des proteines urinaries au labotatoire d'analyses. Ann Biol Clin 2002;60:525–40.
55. Caldini A, Graziani MS. La determinazione delle catene leggere libere nel siero può sostituire la ricerca e quantificazione della proteinuria di Bence Jones nella pratica clinica? Biochim Clin 2013;37:405–18.
56. Schild C, Wermuth B, Trapp-Chiappini D, et al. Reliability of M protein quantification: Comparison of two peak integration methods on Capillarys 2. Clin Chem Lab Med 2008;46:876–7.
57. Vernocchi A, Dolci A, Ceriotti F, et al. Indicazioni per la quantificazione delle componenti monoclonali nel siero. Biochim Clin 2015;39:199–207.
58. Murray DL, Ryu E, Snyder MR, et al. Quantitation of serum monoclonal proteins: Relationship between agarose gel electrophoresis and immunonephelometry. Clin Chem 2009;55:1523–9.
59. Napodano C, Pocino K, Gulli F, et al. Comparison of fully automated and semiautomated systems for protein immunofixation electrophoresis. J Clin Lab Anal 2017;31:2017–8.
60. Mussap M, Ponchia S, Zaninotto M, et al. Evaluation of a new capillary zone electrophoresis system for the identification and typing of Bence Jones Protein. Clin Biochem 2006;39:152–9.
61. Russo F, Valentini V, Basset M, et al. Identification and quantification of urinary monoclonal proteins by capillary electrophoresis in AL amyloidosis. Amyloid 2017;24:66–7.
62. Journal B, Tietsche V, Hungria DM, et al. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia Review article Serum free light chain assays not total light chain assays are the standard of care to assess Monoclonal Gammopathies. Rev Bras Hematol Hemoter 2016;38:37–43.
63. Hungria VTM, Kampanis P, Drayson MT, et al. Comparison of kappa & lambda freelite to total kappa & lambda immunoassays for the detection of monoclonal gammopathies, both as standalone tests and alongside serum protein electrophoresis. Blood 2014;124:5705.
64. Tate J, Bazeley S, Sykes S, et al. Quantitative serum free light chain assay - analytical issues. Clin Biochem Rev 2009;30:131–40.
65. Graziani MS. Measurement of free light chains - Pros and cons of current methods. Clin Chem Lab Med 2016;54:1015–20.
66. Tate JR, Graziani MS, Mollee P, et al. Protein electrophoresis and serum free light chains in the diagnosis and monitoring of plasma cell disorders: laboratory testing and current controversies. Clin Chem Lab Med 2016;54:1–7.
67. Jacobs JFM, Tate JR, Merlini G. Is accuracy of serum free light chain measurement achievable? Clin Chem Lab Med 2016;54:1021–30.
68. Sasson SC, McGill K, Wienholt L, et al. Comparison of the Freelite serum free light chain (SFLC) assay with serum and urine electrophoresis/immunofixation and the N Latex FLC assay. Pathology 2015;47:564–9.
69. Hoedemakers RMJ, Pruijt JFM, Hol S, et al. Clinical comparison of new monoclonal antibody-based nephelometric assays for free light chain kappa and lambda to polyclonal antibody-based assays and immunofixation electrophoresis. Clin Chem Lab Med 2012;50:489–95.
70. Ghillani P, Dufat L, Sterlin D, et al. Analytical performances of Optilite(R) turbidimeter (The Binding Site): a new dedicated analyser for specific proteins determination. Ann Biol Clin 2017;75:29–37.
71. Infusino I, Borille S, Panteghini M. Valutazione del sistema OptiliteTM per la misura delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero. Biochim Clin 2018;41:148–53.
72. Bossuyt X, Delforge M, Reynders M, et al. Antigen excess detection by automated assays for free light chains. Clin Chem Lab Med 2018;56:235–8.
73. Pieri M, Pignalosa S, Franceschini L, et al. Nephelometric assay of urine free light chains: An alternative and early clinical test for Bence-Jones protein quantification. Clin Chem Lab Med 2018;56:313-15.
74. Pieri M, De Stefano A, Franceschini L, et al. Minimal tumour burden in haematological diseases: a step forward with quantitative assessment of Bence-Jones in nephelometry? Br J Haematol 2016;175:733–5.
75. Lobe M, Pasquale D. Freelite for measurement of urine-free light chains in monoclonal gammopathies. Am J Haematol 2016;12:9–13.
76. Lobe M, Pasquale D. Serum versus urine free light chains for assessment of monoclonal gammopathies. Blood 2015;126:5307.
77. Delgado JC. Value of urinary free light chain testing for monitoring of bence jones proteinuria. J Appl Lab Med 2019;3:1059–60.
78. 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.
79. Terreni A, Caldini A, Graziani MS, et al. Valutazione dell'impatto delle raccomandazioni del Gruppo di Studio SIBioC Proteine sull'operatività dei laboratori italiani. Biochim Clin 2015;39:585–90.
80. Moss MA. Moving toward harmonized reporting for serum and urine elctrophoresis. Clin Chem Lab Med 2016;54:973–9.
81. McCudden CR, Booth RA, Lin DCC, et al. Synoptic reporting for protein electrophoresis and immunofixation. Clin Biochem 2018;51:21–8.
82. Tate J, Graziani MS, Willrich M, et al. Report of Survey conducted by IFCC WG Harmonisation of Interpretive Commenting EQA (WG-ICQA) subgroup: Results of an international survey of the reporting of protein electrophoresis and serum free light chains, and quantification of small monoclonal protein. http://www.ifcc.org/media/477362/results-of-2017-international-survey-on-protein-electrophoresis-2162018.pdf (ultimo accesso: dicembre 2019)
83. Booth RA, McCudden CR, Balion CM, et al. Candidate recommendations for protein electrophoresis reporting from the Canadian Society of Clinical Chemists Monoclonal Gammopathy Working Group. Clin Biochem 2018;51:10–20.
84. Plebani M. Interpretative commenting: A tool for improving the laboratory-clinical interface. Clin Chim Acta 2009;404:46–51.
85. Ceriotti F. Standardizzazione e armonizzazione: SIBioC in prima linea. Biochim Clin 2015;39:48–55.

APPENDICE

ESEMPIO REFERTO 1:
Elettroforesi e immunofissazione su supporto solido; quantificazione densitometrica su campione delle 24 ore.

RICERCA DELLA PROTEINA DI BENCE JONES (prima minzione del mattino)			
Esame	Risultato	Unità di misura	Intervallo di riferimento
U-Immunofissazione *(metodo: gel d'agarosio, limite di sensibilità 10 mg/L)*	Presenza di catene leggere libere monoclonali di tipo κ		
Commento interpretativo:	Ricerca positiva per proteina di Bence Jones κ		
DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLA PROTEINA DI BENCE JONES (raccolta delle 24 ore)			
Esame	Risultato	Unità di misura	Intervallo di riferimento
Diuresi nelle 24 ore	1,8	L/24 h	
U-Proteine Totali *(metodo xx: indicare il metodo impiegato)*	123,5	mg/L	0 - 150
U-Proteine Totali/24 ore	222,3	mg/24 h	0 - 150
U-Bence Jones *(metodo: scansione densitometrica in elettroforesi su gel d'agarosio)*	45,4	mg/L	Assente
U-Bence Jones/24 ore	81,7	mg/24 h	

ESEMPIO REFERTO 2:
Elettroforesi e immunofissazione su supporto solido; quantificazione densitometrica su campione di raccolta prima minzione del mattino.

RICERCA DELLA PROTEINA DI BENCE JONES (prima minzione del mattino)			
Esame	Risultato	Unità di misura	Intervallo di riferimento
U-Immunofissazione *(metodo: gel d'agarosio, limite di sensibilità 10 mg/L)*	Presenza di catene leggere libere monoclonali di tipo λ		
Commento interpretativo:	Ricerca positiva per proteina di Bence Jones λ		
DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLA PROTEINA DI BENCE JONES (campione estemporaneo)			
Esame	Risultato	Unità di misura	Intervallo di riferimento
U-Creatinina	1,8	g/L	
U-Proteine Totali *(metodo xx: indicare il metodo impiegato)*	123,5	mg/L	0 - 150
Rapporto Proteinuria/Creatininuria *(campione della prima minzione giornaliera)*	68,6	mg/g creatinina	0 - 300*
U-Bence Jones *(metodo: scansione densitometrica in elettroforesi su gel d'agarosio)*	45,4	mg/L	Assente
Rapporto Bence Jones/Creatininuria *(campione della prima minzione del mattino)*	25,2	mg/g creatinina	Assente

** Questi valori di riferimento sono puramente indicativi*