

La ricerca della proteina di Bence Jones tra vecchi problemi e recenti raccomandazioni: considerazioni in margine alle linee guida italiane e americane

Michele Mussap

¹Servizio di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova

Il recente documento "linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones", pubblicato su *Biochimica Clinica* a cura del Gruppo di Studio Proteine della SIBioC (1), costituisce un prezioso supporto di lavoro che fa chiarezza su un esame di laboratorio "storico" e di importanza clinica. Il documento segue a distanza di circa due anni un altro documento ufficiale sull'argomento (2), uscito nel 1999 a cura del College of American Pathologists (CAP). Entrambi i documenti sono stati pubblicati in un momento caratterizzato dal crescente interesse sulle problematiche analitiche ed interpretative connesse a questo esame di laboratorio, che talvolta ha generato nel recente passato vivaci dibattiti in sedi nazionali ed internazionali. I principali motivi di un rinnovato interesse sulla proteinuria di Bence Jones derivano da almeno due fattori.

Anzitutto il numero di richieste di quest'esame è aumentato significativamente. Tale aumento è per lo più dovuto all'approfondimento diagnostico di gammopatie monoclonali riscontrate al profilo proteico, il cui riscontro è a sua volta aumentato grazie al miglioramento della sensibilità dei sistemi per l'elettroforesi delle sieroproteine (3). Inoltre, una parte delle richieste è dovuta anche alla consuetudine ancora viva in alcuni ospedali di richiedere questo esame come test di screening a tutti i Pazienti che devono effettuare test radiologici con mezzi di contrasto, nonostante non esista alcuna normativa vigente che ponga vincoli in tal senso e nonostante il lavoro congiunto delle Società scientifiche di laboratorio (SIBioC) e di radiologia per rivedere una pratica clinica "non evidence based".

In secondo luogo, già da anni sono disponibili sul mercato metodi quantitativi immunochimici per la misura nell'urina delle catene leggere libere per mezzo di anticorpi specifici anti-catene leggere libere κ e λ . Si tratta di metodi che oggi sono facilmente eseguibili in tutti i laboratori e applicabili su sistemi diagnostici nefelometrici o turbidimetrici in completa automazione, che consentono tempi analitici molto ridotti rispetto a quelli dei metodi separativi elettroforetici tradizionali (4). I metodi quantitativi immunochimici costituiscono senza dubbio un'attrattiva sia per la velocità e la facilità di esecuzione (non richiedono la concentrazione del campione), sia per l'apparente semplicità interpretativa. Per questi motivi, esistono tentativi di proporre l'uso di questi metodi per la ricerca della proteina di Bence Jones in alternativa ai metodi basati sul frazionamento elettroforetico delle proteine urinarie. Uno degli scopi più importanti delle raccomandazioni e linee guida sulla proteinuria di Bence Jones è quello di fare chiarezza ed evitare fughe in avanti, rischiose per il laboratorista e per il clinico, "fissando" alcuni punti fermi che dovrebbero costituire la base di partenza per eventuali discussioni future.

Le linee guida della SIBioC e del CAP sono strutturate in modo sostanzialmente diverso tra loro e in alcuni punti contengono anche raccomandazioni diverse, ma entrambe sono state preparate da rispettivi gruppi di esperti che per la loro provata esperienza e competenza scientifica rappresentano un autorevole riferimento.

Il documento SIBioC è centrato soprattutto sugli aspetti analitici legati alla ricerca della

proteinuria di Bence Jones ed alla sua quantificazione e rimanda a due appendici gli aspetti più squisitamente fisiopatologici e clinici. Nel documento viene riproposta ed enfatizzata la definizione di "proteina di Bence Jones", sulla base della quale viene poi indicato il metodo di scelta per la sua ricerca e tipizzazione, cioè l'immunofissazione. In altre parole, la monoclonalità di catene leggere libere nell'urina può essere evidenziata solo attraverso la valutazione morfologica del tipico aspetto omogeneo osservabile all'elettroforesi. L'uso di metodi quantitativi immunochimici viene invece sconsigliato. I limiti di questi metodi non derivano solo dalla loro incapacità di evidenziare la monoclonalità delle catene leggere libere, non consentendo di fatto la diagnosi di proteinuria di Bence Jones, ma anche dal fatto che non esistono materiali di calibrazione tarati su standard internazionali di riferimento né adeguati materiali di controllo. Inoltre, la peculiarità chimico-fisica e strutturale di ogni singola proteina di Bence Jones può creare talvolta problemi di affinità per l'anticorpo, per forza di cose limitato nella sua specificità verso un antigene così particolarmente polimorfo (5). Tale problema è molto ridotto quando si lavora in grande eccesso di anticorpo, come appunto nell'immunofissazione, ma può risultare importante in nefelometria e in turbidimetria, dove devono essere rispettati ben definiti rapporti molarari tra antigene, anticorpo ed altri costituenti (tamponi, diluenti) della miscela di reazione. In definitiva, le misure immunometriche di catene leggere libere urinarie possono risultare inaccurate, costringendo quantomeno il Paziente in monitoraggio ad eseguire i controlli sempre nel medesimo laboratorio.

Il documento del CAP consiste invece di 9 linee-guida focalizzate sulla valutazione clinica e laboratoristica dei Pazienti con gammopatia monoclonale. La linea guida n.5 è dedicata alla ricerca delle catene leggere libere monoclonali nell'urina. Con tipico stile anglosassone, in meno di 7 righe di una pagina a doppio incolonnamento, il CAP indica il tipo di campione da usare, il metodo per la misura della proteinuria totale, il tipo di misura quantitativa (densitometria del picco elettroforetico riferibile alla proteina di Bence Jones), il fattore di concentrazione del campione di urina (=100 x) e il test di scelta (immunofissazione) per la ricerca della proteina. Inoltre, il CAP sconsiglia l'uso di test preliminari di screening basati su metodi come il dipstick, l'acido sulfosalicilico o la precipitazione al calore.

I due documenti concordano su alcuni "punti chiave" che, sulla base anche della letteratura specifica, possono considerarsi "inconfutabili". Su questi punti, ogni ulteriore discussione dovrebbe avvenire solo se emergessero nuove evidenze sperimentali. A mio parere, questi "punti fermi" sono:

1. La definizione di proteina di Bence Jones: catene leggere libere monoclonali
2. La diagnostica non può che basarsi su metodi in grado di consentire la valutazione della morfologia monoclonale (ovvia conseguenza del primo punto)
3. L'abbandono definitivo di metodi di screening quali la determinazione delle proteine totali, il dipstick e i test di precipitazione al calore.

D'altra parte, i due documenti divergono su qualche punto. Uno dei più significativi è il tipo di campione di urina da raccogliere: le linee guida del CAP raccomandano la raccolta delle 24 ore, quelle della SIBioC la seconda minzione del mattino. Sul problema della quantificazione della proteina di Bence Jones, il documento SIBioC evidenzia alcune critiche alle linee guida del CAP, tra cui la valutazione densitometrica del picco all'elettroforesi, ma conclude segnalando che esso rimane l'unico metodo consigliabile in mancanza di valide alternative. È evidente che le divergenze rivelano una certa difficoltà di suggerire scelte che comunque rappresentano il minore dei mali e non il metodo migliore.

Scopo di questa nota è quello di evocare un dibattito basato su esperienze personali e dati della letteratura, stimolando anche un approfondimento che possa nel tempo portare alla definizione delle seguenti problematiche:

1. La scelta del tipo di campione
2. La scelta del trattamento preanalitico e la conseguente scelta dei coloranti (l'uso di campione nativo abbinato a coloranti ad elevata sensibilità - coloranti colloidali - o di campione concentrato abbinato a coloranti tradizionali)
3. La scelta del tipo di anticorpi da usare nell'immunofissazione
4. La scelta di metodi quantitativi immunometrici e densitometrici nel monitoraggio

delle gammopatie monoclonali

5. Il ruolo innovativo che l'elettroforesi capillare zonale (CZE) può assumere nell'immediato futuro per la risoluzione delle problematiche legate alla diagnostica ed al monitoraggio

La scelta del tipo di campione da usare per la ricerca della proteina di Bence Jones è un problema che riguarda non solo questo esame, ma più in generale tutte le determinazioni di proteine ed enzimi urinari. Non vi è infatti ancora un accordo definitivo sul tipo di campione e, di riflesso, sulla modalità di espressione dei risultati (6,7). Basti pensare che nella letteratura mondiale è consolidato l'uso di riportare i livelli decisionali di microalbuminuria contemporaneamente espressi per come velocità di eliminazione ($\mu\text{g}/\text{min}$ o mg/die), oppure come concentrazione di massa rapportata all'unità di volume (mg/L). I vantaggi che derivano dall'uso della raccolta delle 24 ore (eliminazione di falsi negativi dovuti alla variabilità intragiornaliera di escrezione della proteina di Bence Jones, concentrazione di piccole quantità di proteina) sono parzialmente bilanciati dagli svantaggi (degradazione della proteina da parte della flora batterica e degli enzimi proteolitici, difficoltà della raccolta). Tuttavia, l'aggiunta di un idoneo conservante alla raccolta delle 24 ore può ridurre significativamente i processi di degradazione delle catene polipeptidiche, riducendoli al solo tempo di permanenza del campione in vescica (8). Pertanto, se la raccolta viene effettuata correttamente e con idonei conservanti, è possibile la scelta del campione delle 24 ore o, almeno, il campione della notte, che sembra poter fornire risultati sovrapponibili, come dimostrato da Brigden ML, e al. (6).

Per quanto riguarda il secondo punto, il documento SIBioC appare possibilista, poiché non preclude a priori alcun tipo di scelta, indicando invece la necessità di poter rilevare la proteina fino a valori intorno ai $10 \text{ mg}/\text{L}$. D'altra parte, le linee guida del CAP indicano l'uso di un campione concentrato 100 volte per la misura densitometrica del picco monoclonale corrispondente alla proteina di Bence Jones e per l'esecuzione dell'immunofissazione. In entrambi i documenti, invece, non vengono fornite raccomandazioni sui metodi di concentrazione. Secondo una ricerca del 1998 effettuata nel Regno Unito dal NEQAS (UK - National External Quality Assessment Scheme), il 35% dei laboratori non è in grado di rivelare la presenza della proteina di Bence Jones per valori di concentrazione intorno ai $60 \text{ mg}/\text{L}$ (9). Ciò deriva dalla bassa sensibilità dei metodi o dei coloranti usati. Anche se alcuni Ricercatori ritengono questo dato di scarso interesse, perché valori di Bence Jones $<60 \text{ mg}/\text{L}$ sono osservabili solo nelle gammopatie monoclonali di incerto significato, altri sottolineano al contrario l'importanza di riscontrare la presenza della proteina anche al di sotto di questo valore soglia, per valutare con gli altri parametri biochimici, ematologici e clinici il rischio di evoluzione maligna (10). In definitiva, la scelta del tipo di campione e del colorante è vincolata alla sensibilità analitica desiderata. L'uso del campione nativo e di coloranti colloidali consente almeno due vantaggi: a) il campione non corre il rischio di essere parzialmente denaturato dalla concentrazione; b) si risparmia il costo del concentratore. Come svantaggio rimane l'allungamento dei tempi di incubazione per la colorazione dei supporti. La concentrazione del campione consente il vantaggio di aumentare la sensibilità analitica fino a circa $1 \text{ mg}/\text{L}$. È tuttavia importante adottare la precauzione di non concentrare eccessivamente il campione ($>100 \times$) allo scopo di evitare l'eccessiva viscosità, l'eccessivo "rumore di fondo" e la presenza di "artefatti" derivanti dall'eccesso di colore dovuto a grandi quantità di proteine. Inoltre, è opportuno usare sistemi concentratori in grado di garantire nella quota concentrata l'integrità delle catene polipeptidiche (11) ed il recupero di tutti i peptidi con peso molecolare inferiore o uguale a quello delle catene leggere libere (circa 11.000 Dalton). I concentratori centrifughi, dotati di membrane filtranti con cut-off fino a 10.000 Dalton sono ormai diffusi in molti laboratori e consentono di ottenere buoni risultati rispettando le condizioni descritte.

La tipizzazione immunologica della proteina di Bence Jones consiste nel determinare il tipo di catena leggera libera monoclonale: κ o λ . L'immunofissazione è il test più diffuso nei laboratori ed è il test consigliato sia nelle linee guida SIBioC che in quelle del CAP. Per la sua esecuzione, vengono comunemente usati i supporti in gel d'agarosio per l'immunofissazione su siero che, come noto, dispongono di 6 "canaline" nelle quali possono essere dispensati i diversi anticorpi. La raccomandazione SIBioC propone l'uso

di anticorpi anti catene leggere κ e λ totali, abbinati all'anticorpo anti catena pesante corrispondente alla componente monoclonale sierica. La raccomandazione del CAP non fornisce indicazioni in merito. La scelta indicata nel documento SIBioC deriva tra l'altro dall'esigenza di tutelare uno standard qualitativo elevato per il test di immunofissazione, senza per questo dover esprimere indicazioni di tipo commerciale. In altre parole, la qualità degli anticorpi anti catene leggere κ e λ totali presenti sul mercato è largamente standardizzata anche a costi relativamente competitivi, grazie al volume di produzione e all'esperienza di molti anni di quasi tutte le Industrie del settore. Pertanto, qualsiasi scelta commerciale da parte del singolo laboratorio non può più di tanto abbassare la qualità del test. Al contrario, la qualità degli anticorpi anti catene leggere κ e λ libere dipende più strettamente da specifiche caratteristiche produttive, talvolta molto diverse tra le varie Industrie. Ecco perché spesso questi anticorpi dimostrano bassa avidità, un basso titolo e fenomeni di cross-reattività con le catene leggere legate. Ciò accade soprattutto per anticorpi anti catene leggere κ e λ libere prodotti da Industrie con scarsa esperienza nel settore e a bassi costi. Inseguendo la sirena del risparmio (illusorio!) piuttosto che la conoscenza professionale si rischia con l'uso di questi anticorpi un numero inaccettabile di falsi negativi e di falsi positivi. D'altra parte noi pensiamo che, privilegiando una scelta di qualità, l'uso di anticorpi anti catene leggere κ e λ libere possa diventare la scelta di base per la corretta tipizzazione della proteina di Bence Jones. Nella nostra realtà, sono ormai più di 10 anni che usiamo questo tipo di anticorpi prodotti da un'Industria fra le più importanti del mercato, che possiede una grande esperienza nel campo dell'immunologia diagnostica. Infine in alcuni casi, come ad esempio nelle gammopatie monoclonali costituite da sole catene leggere, l'uso del tipo di anticorpi indicati nella raccomandazione SIBioC potrebbe porre qualche problema nella corretta evidenziazione della proteina di Bence Jones.

La possibilità di misurare con metodi immunologici la quantità di catene leggere libere nei liquidi biologici risale a molti anni fa. Fin dal 1965 sono stati proposti e messi a punto numerosi metodi (immunodiffusione semplice, RID, immunoprecipitazione, RIA, EIA, turbidimetria, nefelometria, ecc.) basati sull'uso di anticorpi specifici anti catene leggere libere (12-15). Ci sembra doveroso sottolineare anzitutto che la determinazione quantitativa di catene leggere libere non è un'esigenza "commerciale", né deve essere interpretata come "scorciatoia" in laboratorio per ridurre i tempi analitici dell'immunofissazione, o peggio ancora per ridurre i costi. È invece un test di sicuro valore clinico, in grado di incidere sull'outcome del Paziente se correttamente interpretato assieme agli altri segni clinici, strumentali e di laboratorio. Vale la pena di riportare quanto dichiarato nel 1993 da CR Tillyer, in un articolo nel quale l'Autore si chiedeva "perché misurare le catene leggere?". Dopo aver illustrato in dettaglio le principali motivazioni cliniche, Egli concludeva dicendo: "Esistono tre aree principali di interesse clinico (disordini della linea B-cellulare, sclerosi multipla, diabete) nelle quali la misura delle catene leggere libere non rappresenta un mero epifenomeno, ma riveste un ruolo utile nella diagnosi e nel management di malattie specifiche" (16). Tale esigenza è poi riscontrabile in gran parte della letteratura, anche se spesso accompagnata da considerazioni critiche sui limiti dei metodi valutati. Un recentissimo studio sulla valutazione di un metodo immunologico in turbidimetria (noncompetitive near infrared particle immunoassay - NIPIA) per la misura di catene leggere libere nel siero e nell'urina, ha riproposto pregi e limiti di questo tipo di esame (17). A nostro avviso, il problema centrale va identificato nella seguente domanda: è meglio sconsigliare in ogni caso la determinazione quantitativa di catene leggere libere, sulla base dei ben noti e descritti limiti che possiede, o è meglio dare indicazioni mirate a ridurre il più possibile le problematiche inerenti il test, garantendo al contempo un'informazione importante per il clinico? Pur concordando in molti punti su quanto puntualizzato in un commento sul lavoro di Bradwell (18), nella nostra pratica routinaria abbiamo scelto di integrare la valutazione morfologica e la tipizzazione immunologica con la misura quantitativa della proteina, eseguita con un metodo in nefelometria. Tale scelta non comporta alcuna variazione dell'iter diagnostico del laboratorio, fermo restando che la ricerca e la tipizzazione continuano ad essere eseguite con metodi elettroforetici. Siamo sicuramente favoriti dal fatto che la stragrande maggioranza dei monitoraggi viene effettuata costantemente nel nostro laboratorio e ciò consente l'interpretazione dei

risultati sulla base del confronto tra misure. Ma sappiamo anche che il clinico valuta attentamente la concentrazione della proteina di Bence Jones nei Pazienti in terapia, e sulla base dei risultati prende opportune decisioni terapeutiche. Siamo anche convinti che sia necessario confrontare sempre i valori di concentrazione delle catene leggere libere con quelli delle proteine totali urinarie, allo scopo di fornire un valore aggiunto interpretativo al referto. Infatti, in Pazienti con proteinuria di Bence Jones, è sempre importante valutare non solo l'evoluzione del processo proliferativo che sta alla base di questo riscontro, ma anche la funzione renale, tenuto conto del noto effetto nefrotossico che la proteina di Bence Jones esercita. Il confronto tra la concentrazione di Bence Jones e quella delle proteine totali permette di individuare precocemente la perdita con l'urina di altre proteine, segno inequivocabile di una sofferenza funzionale dei distretti glomerulare e/o tubulare. Anche da un punto di vista analitico, il dato della proteinuria totale può consentire di sospettare falsi negativi che possono occasionalmente derivare da fenomeni di eccesso d'antigene. Infine, l'aggiunta della proteinuria non influisce significativamente sui tempi di risposta e sui costi, potendo disporre di metodi che usano reagenti poco o quasi nulla costosi (acido tricloroacetico, ecc.). Tutto ciò non rappresenta un punto di contrasto con le raccomandazioni SIBioC, ma semmai ne integra lo spirito ed il messaggio. Il documento ufficiale deve infatti prendere in esame le priorità nella pratica routinaria e tra queste vi è quella di scoraggiare la tendenza di un uso improprio di questo tipo di test nei laboratori.

L'ultimo punto getta una nuova luce su prospettive molto promettenti. Non c'è dubbio, infatti, che l'elettroforesi capillare zonale (CZE: capillary zone electrophoresis) rappresenti un "cambio epocale" ancora troppo poco conosciuto nei suoi vari aspetti tecnici ed applicativi; tuttavia, per chi si occupa di proteine e, più in generale, per tutti i laboratoristi, la CZE rappresenta non solo una sfida, ma un'importante opportunità che non può e non deve essere sprecata. La possibilità di usare la CZE per l'identificazione e la tipizzazione della proteina di Bence Jones elimina gran parte delle problematiche legate al tipo di campione, alla scelta del colorante e alla determinazione quantitativa (19). Infatti, l'uso della CZE dovrebbe portare non pochi vantaggi, tra cui una fase preanalitica meno problematica (il campione di urina dovrebbe essere desalificato, ma non concentrato), l'abbandono dei coloranti, la lettura diretta delle frazioni proteiche a 214 nm. Di conseguenza, la valutazione quantitativa del picco monoclonale non dipenderà dalla valutazione dell'intensità di un colore, e la CZE potrà perciò essere proposta quale metodo di scelta per la misura quantitativa della proteina di Bence Jones, mettendo tutti d'accordo e ponendo la parola fine al tormentone: metodi quantitativi sì, metodi quantitativi no.

In conclusione, il documento proposto dal gruppo di studio della SIBioC deriva da esperienze maturate nel tempo da "Esperti" del settore e pertanto va riconosciuta l'autorevolezza dei suggerimenti contenuti nel documento. La diffidenza, spesso non dichiarata ma coltivata da molti specialisti del laboratorio clinico, verso il proliferare delle linee-guida deriva dalla presenza di molte linee-guida scritte da falsi esperti e studiosi imparatici (last-minute experts) su qualsiasi argomento. Tutto ciò deve essere superato da una lettura attenta dei documenti e da un altrettanto attenta e motivata riflessione su problemi "aperti" che sono evidenziabili e presenti in tutte le linee-guida emanate da veri "Esperti", come nel caso di quelle emanate dal Gruppo di Studio sulle Proteine della SIBioC.

Ma per implementare correttamente una linea-guida, oltre ad un generico consenso, è necessaria la volontà dei professionisti di tradurre nella pratica il razionale teorico, ossia far camminare le parole (walk the talk), lasciando ad altri la velleità di scrivere linee-guida su tutto lo scibile della Medicina di Laboratorio. La traduzione in pratica di linee-guida qualificate deve stimolare la volontà di aggiornarsi e di studiare continuamente, deve diventare un aiuto prezioso alla difesa della professionalità dei laboratoristi, troppo spesso saccheggiate ed oltraggiata da chi vorrebbe imporre, dall'esterno ma anche dall'interno, la logica del solo risparmio economico e del minimo sforzo lavorativo. Ogni balzo in avanti privo di un solido supporto scientifico e culturale alimenta l'idea che appaltare un laboratorio ospedaliero sia un'operazione vantaggiosa per la Sanità Pubblica, alla stessa stregua degli appalti sulle lavanderie o sulle cucine.

BIBLIOGRAFIA

1. Graziani MS, Merlini G, Petrini C. Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. *Bioch Clin* 2001;
2. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, Gorevic PD, Kyle RA, Tomar RH. Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:106-7
3. Merlini G, Aguzzi F, Whicher J. Monoclonal gammopathies. *J Int Fed Clin Chem* 1997;9:171-6
4. Tillyer CR, Iqbal J, Raymond J, Gore M, McIlwain TJ. Immunoturbidimetric assay for estimating free light chains of immunoglobulins in urine and serum. *J Clin Pathol* 1991;44:466-9
5. Berggård I, Petersen PA. Polymeric forms of free normal kappa and lambda chains of human immunoglobulins. *J Biol Chem* 1969;244:4299-305
6. Bridgen ML, Neal ED, McNeely MDD, Hoag GN. The optimum urine collections for the detection and monitoring of bence Jones proteinuria. *Am J Clin Pathol* 1990;93:689-93
7. Pezzoli A, Pascali E. Urine collection for the detection of Bence Jones proteinuria. *Am J Clin Pathol* 1991;95:266-7
8. Tencer J, Thysell H, Andersson K, Grubb A. Stability of albumin, protein HC, immunoglobulin G, - and -chain immunoreactivity, orosomuroid and α_1 -antitripsin in urine stored at various conditions. *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54:199-206
9. Ward AM, White P. Summary for UK NEQAS monoclonal protein distribution 986, UK NEQAS for monoclonal proteins. Sheffield: UK NEQAS for immunology and immunochemistry, 1998
10. Beetham R. Detection of Bence-Jones protein in practice. *Ann Clin Biochem* 2000;37:563-70
11. Lindstedt G, Lundberg P-A. Loss of tubular proteinuria pattern during urine concentration with a commercial membrane filter cell (Minicon B15 system). *Clin Chim Acta* 1974;56:125-6
12. Tan M, Epstein WV. A direct immunologic assay of human sera for Bence Jones proteins (L-chains). *J Lab Clin Med* 1965;66:344-7
13. Robinson EL, Gowland E, Ward ID, Scarffe JH. Radioimmunoassay of free light chains of immunoglobulins in urine. *Clin Chem* 1982;28:2254-60
14. Brouwer J, Otting-van der Ruit MO, Busking-van der Lely HB. Estimation of free light chains of immunoglobulins by enzyme immunoassay. *Clin Chim Acta* 1985;150:267-71
15. Levinson SS. Studies of Bence Jones proteins by immunonephelometry. *Ann Clin Lab Sci* 1992;22:100-9
16. Tillyer CR. Clinical applications of immunoglobulin free light chain estimation. *Int J Clin Lab Res* 1993;23:25-9
17. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Graham PM, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT. Highly sensitive automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001;47:673-80
18. Graziani MS, Merlini GP. Measurement of free light chains in urine.[Letter] *Clin Chem* 2001;47:2069
19. Jenkins MA, O'Leary TD, Guerin MD. Identification and quantitation of human urine proteins by capillary electrophoresis. *J Chromatog B Biomed Appl* 1994;662:108-12