

Indicazioni per il corretto impiego delle indagini biochimiche nelle gammopatie monoclonali con particolare riferimento alla determinazione delle catene leggere libere delle immunoglobuline nel siero

Documento aziendale per la promozione dell'uso appropriato degli esami di laboratorio

Alberto Dolci, Ilenia Infusino, Roberta Mozzi, Mauro Panteghini

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera "Luigi Sacco" e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Cliniche, Università degli Studi, Milano

ABSTRACT

Recommendations for use of biomarkers in monoclonal gammopathies with special reference to serum free light chain measurements. Monoclonal gammopathies (MG) are a group of disorders characterized by the proliferation of one plasma cell clone, which produces a monoclonal protein identified by serum proteins electrophoresis as a homogeneous band defined monoclonal component (MC). Multiple myeloma constitutes the prototype of malignant MG, but most frequently MCs refer to MG of undetermined significance (MGUS). Serum and urinary protein electrophoresis and immunofixation (IFE) are the only analytical techniques able to identify an immunoglobulin as monoclonal permitting to diagnose, quantify and type the MC with a sensitivity close to 100%. Serum free light chain (fLC) determination through κ/λ ratio calculation is a sensitive biomarker of clonal expansion recommended for diagnosis and follow-up of light chain and non-secretory myelomas. In the AL-amyloidosis diagnosis, the fLC assay shows ~85-90% sensitivity, increasing to 95% when associated to serum IFE and to 100% when both serum and urine IFE are added. Moreover, in the disease follow-up the decrease of circulating concentrations of amyloidogenic fLCs is associated with a prolongation of survival. An abnormal serum fLC κ/λ ratio has also been suggested as an independent risk factor for malignant progression in MGUS, but this application needs further validation. A diagnostic algorithm for MG by using only serum IFE and fLC assays has been evaluated showing that in 18% of myeloma patients with Bence Jones proteinuria the serum fLC κ/λ ratio is within the reference limits. Then, the serum fLC measurement can not replace 24 h urine protein estimation in patients with myeloma.

INTRODUZIONE

Le gammopatie monoclonali (GM) rappresentano un gruppo di patologie caratterizzate dalla proliferazione di uno o più cloni plasmacellulari di derivazione B linfocitaria, ognuno dei quali produce una quantità variabile di immunoglobuline (Ig) omogenee dal punto di vista strutturale e immunologico che costituisce la componente monoclonale (CM) o paraproteina, rilevabile nel siero o nelle urine del soggetto con GM. La CM circolante è in genere costituita da una Ig completa, ma può essere formata da catene leggere libere (fLC) o più raramente da catene pesanti non legate ad alcuna catena leggera. A livello molecolare, le CM sono riconducibili ad uno dei cinque isotipi di catene pesanti (γ , α , μ , δ , ϵ) e ad uno dei due isotipi di catene leggere (κ o λ), assemblate tra loro in tutte le combinazioni possibili, comprese quelle incomplete di sole catene pesanti (ad eccezione delle ϵ , finora mai descritte) o di fLC. Le CM urinarie clinicamente più significative sono rappresentate dalla proteina di Bence Jones (BJP), costituita da fLC monoclonali, ma nelle urine si possono rilevare anche CM costituite da Ig complete.

La presenza di una CM sierica o urinaria e la loro quantificazione rappresentano importanti biomarcatori di malattia da proliferazione linfoplasmacellulare, efficaci

nella diagnosi, nella definizione della prognosi e nel monitoraggio dei pazienti affetti da queste patologie.

Le GM comprendono condizioni cliniche riconducibili a tre diversi meccanismi eziopatogenetici:

- 1) forme clinicamente manifeste, dovute alla proliferazione del clone neoplastico, classificabili come malattie linfoproliferative maligne (Tabella 1);

Tabella 1

Gammopatie monoclonali maligne

Mieloma multiplo e sue varianti:

- "smoldering" mieloma e mieloma indolente
- mieloma non secernente
- mieloma osteosclerotico
- mieloma micromolecolare
- IgM-mieloma

Altre discrasie plasmacellulari:

- leucemia plasmacellulare
- plasmocitoma solitario midollare ed extramidollare

Malattie linfoproliferative:

- macroglobulinemia di Waldenström
- malattie delle catene pesanti di tipo α , γ e μ
- linfoma non-Hodgkin, leucemia linfatica cronica

- 2) forme clinicamente manifeste, dovute agli effetti patologici diretti delle CM (Tabella 2);
- 3) forme asintomatiche, che si dividono in:
 - a) GM di incerto significato (MGUS), di tipo IgG, IgA, IgM, IgD, IgE e BJP idiopatica;
 - b) GM transitorie, legate ad alterazioni immunologiche di differente origine, tra cui le GM da trasferimento placentare nei neonati, quelle associate ad infezioni pediatriche, ad infezioni virali, a trattamento con farmaci, da ricostituzione del repertorio midollare dopo trapianto allogenico, ecc.

INDAGINI BIOCHIMICHE

Ricerca, caratterizzazione e quantificazione delle componenti monoclonali

Separazione elettroforetica delle proteine sieriche ed urinarie

L'elettroforesi (EF) e l'immunofissazione (IFE) delle sieroproteine costituiscono le uniche indagini biochimiche in grado di evidenziare la monoclonalità di una Ig nel siero, di caratterizzarla come CM e di porre quindi la diagnosi di GM. Di conseguenza, deve essere sempre eseguita quando si sospetta una GM maligna o una patologia correlata alla possibile presenza di CM. L'assenza di CM all'elettroforesi non esclude tuttavia la presenza di una neoplasia dei B linfociti; per questo in presenza di un fondato sospetto clinico è necessario eseguire la IFE del siero, che fornisce, a parità di tecnica separativa, una sensibilità circa 10 volte superiore rispetto all'EF, e quella delle proteine urinarie, in quanto la ricerca della BJP è altrettanto importante dal punto di vista diagnostico, soprattutto nel caso di GM da fLC.

Le tecniche utilizzate per l'EF sono quelle su supporto solido di gel di agarosio (AGE), che possono essere eseguite con sistemi manuali o analizzatori semiautomatici, che si avvalgono di stazioni di campionamento, e quelle in EF capillare zonale (CZE), eseguite su analiz-

zatori automatici chiusi, con parametrizzazione non modificabile. Le correnti linee-guida 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 -globulinica della transferrina dal fattore C3 del complemento, di norma ampiamente ottenibile con qualsiasi tecnica, supportata o capillare (1). Questo requisito dovrebbe permettere di rilevare anche le CM di piccola entità che migrano in zona β -globulinica, che spesso sono difficili da separare dalle altre proteine che migrano nella stessa zona.

Per la ricerca della BJP nelle urine, il metodo consigliato dalle linee guida è l'IFE (2), mentre la semplice esecuzione dell'EF delle proteine urinarie come esame diagnostico non è consigliabile per le sue minori sensibilità e specificità.

Caratterizzazione e quantificazione delle componenti monoclonali

In caso di (sospetta) presenza di CM all'EF delle sieroproteine deve essere sempre associata l'immunotipizzazione mediante IFE o immunosottrazione (ISE) per confermare (o meno) e caratterizzare la CM evidenziata all'EF. In generale, si ritiene l'IFE più sensibile dell'ISE nel rilevare e caratterizzare le CM per le caratteristiche intrinseche del metodo che aggiunge proteina (l'anticorpo specifico) a proteina (la CM), anziché sottrarre la CM come nell'ISE (3). Sono tuttavia state descritte CM rilevate in ISE ma non in IFE, specialmente in zona β -globulinica, che possono arrivare fino al 3% dei casi studiati (4).

Ogni CM presente nel siero rilevata all'EF deve essere quantificata sul tracciato elettroforetico mediante lettura densitometrica (AGE) o spettrofotometrica (CZE), perché la concentrazione della CM evidenziata all'EF rappresenta un criterio diagnostico per porre diagnosi differenziale tra MGUS (CM <30 g/L) e mieloma multiplo (CM >30 g/L) (5), un parametro per valutare il rischio di progressione di una MGUS verso il mieloma e, nel caso di mieloma e disordini correlati, un indice di risposta alla terapia (6). La quantificazione della CM mediante la misura diretta della concentrazione delle Ig sieriche con metodi immunometrici può invece risultare poco accurata perché il calibratore nel saggio, costituito da Ig policlonali, e la CM nel siero non reagiscono allo stesso modo con l'antisiero utilizzato nel metodo di misurazione (mancanza di parallelismo) e perché la proteina monoclonale può presentare, seppure raramente, specificità antigeniche poco e mal riconosciute dall'antisiero impiegato (7). Solo nei soggetti con CM a migrazione sovrapposta ad altre proteine, come nel caso di CM IgA che migrano in zona β_2 -globulinica insieme al fattore C3 del complemento o in zona β_1 -globulinica con la transferrina, nei quali la CM risulta difficilmente isolabile sul tracciato elettroforetico, è consigliabile la quantificazione della CM con metodi immunochimici (nefelometria o turbidimetria).

In caso di sua presenza nelle urine, la quantificazione della BJP può fornire utili informazioni per porre dia-

Tabella 2

Malattie con patogenesi dovuta alla presenza di una componente monoclonale

Crioglobulinemia di tipo I e II

Malattia cronica da crioagglutinine

Malattie da deposizione di immunoglobuline monoclonali:

Amiloidosi AL

Malattia da deposizione di catene leggere

Malattia da deposizione di catene leggere e pesanti

Sindrome di Fanconi acquisita dell'adulto

Sindrome da alterata permeabilità capillare sistemica

Scleromixedema o lichen myxedematosus

Sindrome da iperviscosità

Polineuropatie

Sindrome POEMS (Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, Monoclonal protein, Skin changes)

gnosi differenziale tra mieloma multiplo e MGUS, per la stadiazione del mieloma multiplo e per la valutazione della risposta alla terapia (6, 8), nonostante la concentrazione di BJP non sia direttamente correlata con la massa neoplastica a causa di ragioni fisiopatologiche, quali il differente grado di polimerizzazione della proteina e la dipendenza della sua concentrazione da eventuali disfunzioni tubulari renali (2). Va ricordato che la quantificazione della BJP si deve eseguire su un campione di urine delle 24 ore (2,9).

Determinazione delle immunoglobuline nel siero

Nello studio delle GM la determinazione della concentrazione nel siero delle IgG, IgA o IgM, meglio se ripetuta nello stesso laboratorio durante tutto il periodo di monitoraggio dello stesso individuo, è utile per il riconoscimento precoce della progressione di malattia e per la quantificazione e il monitoraggio delle ipogammaglobulinemie associate, causate dallo squilibrio funzionale nella sintesi fisiologica di Ig policlonali da parte del midollo osseo dovuto all'eccessiva espansione dei cloni maligni (10).

Determinazione delle catene leggere libere nel siero

La determinazione con metodi immunochimici in fase liquida delle fLC κ e λ nel siero e la stima del rapporto κ/λ rappresenta un buon indice di clonalità ed è raccomandata nella diagnosi e nel monitoraggio delle seguenti GM:

- mieloma non secernente: nei soggetti affetti da tale patologia (circa il 3% di tutti i casi di mieloma multiplo) non è rilevabile alcuna CM nel siero o nelle urine; sono invece misurabili concentrazioni elevate di una fLC con alterazione del rapporto κ/λ in circa il 70% dei casi (11).
- amiloidosi AL: è una patologia caratterizzata da accumulo nei depositi di amiloide di fibrille con conformazione a foglietti β , formate dal frammento N-terminale di una fLC monoclonale (12). Nei soggetti affetti da amiloidosi AL in circa il 50% dei casi non è visibile alcuna CM all'EF delle sieroproteine, per cui, in caso di sospetto clinico, è sempre raccomandato eseguire una IFE del siero, che mostra tuttavia una sensibilità che varia dal 70% al 95% a seconda degli studi, mentre la determinazione delle fLC nel siero è positiva tra 86% e 91% dei casi (13, 14). La combinazione di entrambi gli esami sembra poter fornire la stessa sensibilità (virtualmente il 100%) ottenuta con la combinazione IFE siero più IFE urine (13, 14). Questo dato è stato più di recente un po' ridimensionato (94%), con associata rivalutazione dell'IFE urinaria (15). Essendo la misura delle fLC nel siero una stima diretta della proteina precursore delle fibrille di amiloide AL, la determinazione delle fLC assume inoltre una grande importanza nel trattamento della malattia sistemica, sia per la titolazione della terapia che per la valutazione della risposta (16). Una dimi-

nuzione post-trattamento >50% del valore basale della fLC interessata è associata ad un significativo prolungamento della sopravvivenza e correlata con la simultanea diminuzione delle concentrazioni plasmatiche del frammento N-terminale del peptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP), sensibile biomarcatore di disfunzione cardiaca in questa patologia (17,18).

Oltre che nelle due condizioni cliniche sopra ricordate, la determinazione delle fLC nel siero è stata proposta anche nel mieloma micromolecolare (19). In questa variante del mieloma multiplo, la CM è costituita da fLC, per cui la determinazione delle fLC nel siero rappresenta in teoria il marcatore ideale per il monitoraggio della malattia alla diagnosi (20). Ancora, secondo quanto riportato in un lavoro retrospettivo (21), nelle MGUS il riscontro alla diagnosi di un rapporto κ/λ alterato si assocerebbe ad un rischio significativamente più elevato di progressione maligna della malattia. Va da sé che, data la prevalenza di tale condizione (3,2% nella popolazione di età >50 anni, 5,3% dei soggetti >70 anni e 7,5% dei soggetti >85 anni) (22) e la rilevante percentuale (~1%/anno) di MGUS che progredisce verso il mieloma o altre forme maligne associate, non è assolutamente pensabile di raccomandare la determinazione della fLC sulla scorta dei risultati di un singolo lavoro retrospettivo (23).

Più in generale, nei soggetti con mieloma multiplo è stato suggerito che la misura delle fLC nel siero possa essere considerata un esame alternativo alla ricerca e alla quantificazione della BJP nelle urine nella diagnosi e nel monitoraggio della malattia (24). È noto che la concentrazione di BJP nell'urina è influenzata dal riassorbimento tubulare delle fLC e che le alterazioni glomerulari e tubulari frequenti nei pazienti affetti da mieloma possono portare ad una sottostima della BJP. La determinazione delle fLC nel siero sarebbe quindi, in linea teorica, più vantaggiosa, sia per la maggior sensibilità della metodologia utilizzata, sia perché eliminerebbe completamente l'influenza della variabilità del riassorbimento tubulare sulle concentrazioni urinarie di fLC. In un lavoro del 2006, la combinazione di IFE del siero più misura delle fLC ha mostrato una sensibilità del 99,5% nel rilevare la presenza di BJP urinaria (25), tanto che è stato proposto che la misura delle fLC nel siero e la stima del rapporto κ/λ potrebbero rappresentare una valida alternativa alla quantificazione della BJP nelle urine nel monitoraggio del mieloma multiplo (26). In un più recente lavoro (27) è stato tuttavia dimostrato che il 18% dei pazienti affetti da mieloma con presenza di BJP mostra un valore del rapporto κ/λ nel siero all'interno dell'intervallo di riferimento, concludendo che non è raccomandabile sostituire la ricerca della BJP nelle urine con la misura delle fLC nel siero.

Dal punto di vista analitico va rilevato che solo il reagente proposto originalmente da Bradwell (Freelite™, The Binding Site) ha mostrato sufficiente qualità per la misura delle fLC nel siero, anche se sono stati evidenziati una significativa variabilità tra differenti lotti di antisieri, una possibile scarsa linearità nella risposta alla diluizio-

Tabella 3*Raccomandazioni per l'uso dei biomarcatori nelle gammopatie monoclonali maligne*

Obiettivo clinico	Marcatore	Tempi di valutazione	Criterio interpretativo
Diagnosi	CM (siero/urine) fLC*	-	qualitativo (presenza), rapporto κ/λ <0,26 o >1,65
Bilancio di base ("staging") - Prognosi	CM (siero) β_2 -M, ALB	prima della terapia	la concentrazione della CM è direttamente correlata con l'entità della neoplasia; stadio I: β_2 -M <3,5 mg/L ALB \geq 35 g/L stadio II: non stadio I né III stadio III: β_2 -M \geq 5,5 mg/L**
Risposta al trattamento	CM (siero/urine), fLC	un mese dalla terapia (primo anno) - successivamente in funzione della risposta al trattamento	la risposta al trattamento si classifica come: - completa: IFE (siero e urine) negativa; - completa stringente: come completa più il rapporto κ/λ delle fLC normale; - parziale molto buona: CM (siero e urine) rilevabile alla IFE ma non alla elettroforesi o diminuzione della concentrazione della CM nel siero \geq 90% associata a una CM urinaria <100 mg/24 ore; - parziale: diminuzione della concentrazione della CM nel siero \geq 50% e nelle urine 24 ore \geq 90% o concentrazione CM urine <200 mg/24 ore. Nell'amiloidosi AL una diminuzione post-trattamento della concentrazione di fLC >50% del valore basale è associata ad un significativo prolungamento della sopravvivenza.
Riconoscimento precoce della progressione	CM (siero/urine) fLC*** calcemia	ogni 3-6 mesi	incremento rispetto al valore precedente \geq 25% e, in assoluto, nel siero \geq 5 g/L e nelle urine \geq 200 mg/24 ore; incremento della differenza tra fLC della CM e l'altra fLC >100 mg/L; >11,5 mg/dL

CM, componente monoclonale; fLC, catene leggere libere; β_2 -M, β_2 -microglobulina; ALB, albumina; IFE, immunofissazione.

* nel mieloma non secernente e nell'amiloidosi AL.

** mediana di sopravvivenza: stadio I, 62 mesi; stadio II, 44 mesi; stadio III, 29 mesi (30).

*** da utilizzare nei pazienti con CM non misurabile.

ne dei campioni con elevate concentrazioni e, a volte, una difficile applicabilità a particolari strumentazioni (28, 29).

CONCLUSIONI

Accanto ai metodi consolidati per la ricerca, la caratterizzazione e la quantificazione delle CM sieriche e urinarie, la determinazione delle fLC nel siero può rappresentare un sensibile indicatore delle fLC circolanti e la stima del rapporto κ/λ ricavata da questa determinazione costituisce un attendibile indice di clonalità. La misura delle fLC nel siero è oggi raccomandata per la diagnosi e il monitoraggio dei mielomi non secernenti e della amiloidosi AL. Utile potrebbe rivelarsi anche nel mieloma micromolecolare. La determinazione delle fLC nel siero non può, tuttavia, sostituire la ricerca della BJP nelle urine come esame da utilizzare nella diagnosi e nel monitoraggio della malattia mielomatosa.

La Tabella 3 riassume le principali raccomandazioni per l'impiego dei biomarcatori nelle GM maligne.

BIBLIOGRAFIA

1. Keren DF. Procedures for the evaluation of monoclonal immunoglobulins. Arch Pathol Lab Med 1999;123:126-32.
2. Graziani M, Merlini G, Petrini C. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. Clin Chem Lab Med 2003;41:338-46.
3. 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.
4. Katzmann JA, Clark R, Sanders E, et al. Prospective study of serum protein capillary zone electrophoresis and immunotyping of monoclonal proteins by immunosubtraction. Am J Clin Pathol 1998;110:503-9.
5. 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.
6. Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS, et al. on behalf of International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. Leukemia 2006;20:1467-73.

7. Graziani MS, Dolci A, Greco C, et al. Indicazioni per la richiesta di elettroforesi sieroproteica. *Biochim Clin* 2008;32:48-51.
8. San Miguel JF, García-Sanz R. Multiple myeloma: differential diagnosis and prognosis. In: Gahrton G, Durie BGM, Samson DM, eds. *Multiple myeloma and related disorders*. London: Arnold, 2004:179-99.
9. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, et al. Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:106-7.
10. Gupta S, Comenzo RL, Hoffman BR, et al. National Academy of Clinical Biochemistry guidelines for the use of tumor markers in monoclonal gammopathies. 2005. http://www.aacc.org/NR/rdonlyres/563A170E-63E0-4601-AA9E-E554B1FFA476/0/chp3k_gammopathies.pdf
11. Drayson MT, Tang LX, Drew R, et al. Serum free light-chain measurement for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood* 2001;97:2900-2.
12. Merlini G, Bellotti V. Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med* 2003;349:583-96.
13. Katzmann JA, Abraham RS, Dispenzieri A, et al. Diagnostic performance of quantitative κ and λ free light chain assays in clinical practice. *Clin Chem* 2005;51:878-81.
14. Palladini G, Russo P, Lavatelli F, et al. Diagnostic performance of the quantitative assay for free light chains (Freelite™) in AL amyloidosis. *Clin Chem* 2006;52:A160.
15. Merlini G, Paladini G, Russo P, et al. Usefulness of urine immunofixation electrophoresis in the diagnosis of AL amyloidosis. *Biochim Clin* 2007;31:440.
16. Gertz MA, Comenzo R, Falk RH, et al. Definition of organ involvement and treatment response in primary systemic amyloidosis (AL): a consensus opinion from the 10th International Symposium on Amyloid and Amyloidosis. In: Gateau G, Kyle RA, Skinner M, eds. *Amyloid and amyloidosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004:151-3.
17. Lachmann HJ, Gallimore R, Gillmore JD, et al. Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *Br J Haematol* 2003;122:78-84.
18. Palladini G, Lavatelli F, Russo P, et al. Circulating amyloidogenic free light chains and serum N-terminal natriuretic peptide type B decrease simultaneously in association with improvement of survival in AL. *Blood* 2006;15:3854-8.
19. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, et al. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* 2003;361:489-91.
20. Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT, et al. Serum free light chains for monitoring multiple myeloma. *Br J Haematol* 2004;126:348-54.
21. 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.
22. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006;354:1362-9.
23. Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18:689-707.
24. Bradwell AR. Serum free light chain measurements move to center stage. *Clin Chem* 2005;51:805-7.
25. Katzmann JA, Dispenzieri A, Kyle RA, et al. Elimination of the need for urine studies in the screening algorithm for monoclonal gammopathies by using serum immunofixation and free light chain assays. *Mayo Clin Proc* 2006;81:1575-8.
26. Smith A, Wisloff F, Samson DM, et al. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *Br J Haematol* 2006;132:410-51.
27. Singhal S, Stein R, Vickrey E, et al. The serum-free light chain assay cannot replace 24-hour urine protein estimation in patients with plasma cell dyscrasias. *Blood* 2007;109:3611-2.
28. Tate JR, Mollee P, Dimeski G, et al. Analytical performance of serum free light-chain assay during monitoring of patients with monoclonal light-chain diseases. *Clin Chim Acta* 2007;376:30-6.
29. Tate JR, Dimeski G, Carter AC. Analytical performance of serum free light-chain assay. *Clin Chim Acta* 2007;380:250-1.
30. Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:3412-20.