La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio Italian Journal of Laboratory Medicine

PERCORSO DI LABORATORIO RACCOMANDATO NELLA DIAGNOSI, PROGNOSI E FOLLOW-UP DELLE GAMMOPATIE MONOCLONALI

--Manuscript Draft--

Manuscript Number	DIME D 16 00023P1	
Manuscript Number:	RIME-D-16-00023R1	
Full Title:	PERCORSO DI LABORATORIO RACCOMANDATO NELLA DIAGNOSI, PROGNOSI E FOLLOW-UP DELLE GAMMOPATIE MONOCLONALI	
Article Type:	Review (Rassegna)	
Section/Category:		
Keywords:	Keywords: Monoclonal Component; Monoclonal Gammopathy; Multiple Myeloma; Electrophoresis.	
	Parole chiavi: Componente Monoclonale; Gammopatia Monoclonale; Mieloma Multiplo; Elettroforesi.	
Corresponding Author:	Luigi Cinquanta Dipartimento di Patologia Clinica e Medicina Trasfusionale, S.C. di Patologia Clinica, AOU San Giovanni di Dio e Ruggi D'Aragona Salerno ITALY	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Dipartimento di Patologia Clinica e Medicina Trasfusionale, S.C. di Patologia Clinica, AOU San Giovanni di Dio e Ruggi D'Aragona Salerno	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Luigi Cinquanta	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Luigi Cinquanta	
	Marco Tani	
	Maria Concetta Sorrentino	
	Maria Paola Simula	
	Salvatore Mangraviti	
	Bruno Milanesi	
	Ignazio Brusca	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:		
Abstract:	RECOMMENDED LABORATORY PATH FOR THE DIAGNOSIS, PROGNOSIS AND FOLLOW UP OF MONOCLONAL GAMMOPATHIES. Abstract In Italy, the high occurrence of monoclonal gammopathies in adults and the high frequency of requests for serum protein electrophoresis have two consequences. On one hand it is relatively frequent in a person's history to come across a serum monoclonal component; on the other it is necessary to correctly frame the laboratory data and, consequently, plan the appropriate targeted lab tests. In the last fifteen years, the international scientific publications (mainly by clinical hematologists) have shown the great importance of lab testing in the management of patients with monoclonal gammopathies. However these studies have not always given coherent and precise indications on the appropriate choice of laboratory tests in different clinical situations, or how to correctly perform and interpret them. In this regard, the Study	

Group "Proteins" of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (SIPMeL) has collected in a document a series of "advices" on the use of laboratory tests in the diagnosis, prognosis and follow-up of monoclonal gammopathies, in particular those included in the branch that studies the plasma protein assays. The appendix shows methodological notes concerning controversial analytical and preanalytical aspects of the execution of the main laboratory tests described in the paper.

Riassunto

In Italia, la elevata prevalenza delle gammopatie monoclonali nella popolazione adulta e l'alta cadenza con la quale si richiede l'elettroforesi delle proteine sieriche, per svariate esigenze cliniche, determinano due consequenze. Da una parte è relativamente frequente il riscontro occasionale nella storia di in un individuo di una componente monoclonale (CM) sierica, dall'altra si rende necessario inquadrare correttamente i dati laboratoristici e programmare successivamente esami diagnostici mirati ed appropriati. Il gran numero di lavori scientifici pubblicato a livello internazionale negli ultimi 15 anni, soprattutto da ematologi clinici, ha attribuito una importanza determinante ai test di laboratorio nella gestione dei pazienti con gammopatie monoclonali ma non sempre ha dato indicazioni univoche e coerenti sulla scelta dei test di laboratorio da praticare nelle diverse situazioni cliniche e sulle modalità di esecuzione e d'interpretazione degli stessi. A questo proposito, Il Gruppo di Studio " Proteine" della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) ha considerato opportuno raccogliere in un documento una serie di "raccomandazioni" sull'utilizzo dei test di laboratorio, in particolare di quelli compresi nella disciplina Protidologia, nella diagnosi, prognosi e follow-up delle gammopatie monoclonali. In appendice vengono riportate note metodologiche riguardanti aspetti pre-analitici e analitici controversi, relativi all'esecuzione dei principali esami di laboratorio descritti nel testo.



Conflict of Interest Disclosure Form

È politica La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio-Italian Journal of Laboratory Medicine garantire l'equilibrio, l'indipendenza, l'obiettività e il rigore scientifico dei suoi contenuti. Tutti gli autori sono tenuti a esplicitare ai lettori un conflitto reale o apparente di interessi che possono avere un rapporto diretto con il loro articolo.

Questo riguarda i rapporti con le aziende farmaceutiche, i produttori di dispositivi biomedicali o altre società i cui prodotti o servizi possono essere correlati all'argomento dell'articolo o alla sponsorizzazione dello studio descritto.

Non si vuole assolutamente contrastare la pubblicazione di articoli da parte di autori con un potenziale conflitto di interessi. L'esplicitazione di quest'ultimo infatti è necessario esclusivamente ai lettori, che avranno così gli strumenti per potersi formare un proprio giudizio e stabilire se il conflitto di interessi abbia o meno portato a una possibile distorsione sia nell'esposizione sia nelle conclusioni presentate.

Si prega il *corresponding author* di compilare e inviare il modulo per l'*Editor-in-Chief* per conto di tutti gli autori elencati di seguito.

It is the policy of *La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio-Italian Journal of Laboratory Medicine* to ensure balance, independence, objectivity, and scientific rigor in the Journal. All authors are expected to disclose to the readers any real or apparent conflict(s) of interest that may have a direct bearing on the subject matter of the article. This pertains to relationships with pharmaceutical companies, biomedical device manufacturers or other corporation whose products or services may be related to the subject matter of the article or who have sponsored the study.

The intent of the policy is not to prevent authors with a potential conflict of interest from publication. It is merely intended that any potential conflict should be identified openly so that the readers may form their own judgements about the article with the full disclosure of the facts. It is for the readers to determine whether the authors' outside interest may reflect a possible bias in either the exposition of the conclusions presented.

The corresponding author will complete and submit this form to the Editor-in-Chief on behalf of all authors listed below.

Rivista/Journal LA RIVISTA ITALIANA DI MEDICINA DI LABORATORIO

Titolo dell'Articolo/Article Title
PERCORSO DI LABORATORIO RACCOHANDATO NELLA DIAGNOSI, PROGNOSI

E FOLLOW-UP DELLE GAMMOPATIE MONOCLONALI

Autori/Authors
L. CINQUANTA, M. TANI, M.C. SORRENTINO, M.P. SIMULA, S. MANGRAVITI,
B. MILANESI, J. BRUSCA

Per cortesia tenga presente che il conflitto di interessi verrà pubblicato su ogni articolo.

Please note that a conflict of interest statement is published with each paper.

Per cortesia dichiari qui di seguito l'eventuale conflitto di interesse

If any conflict exists, please define hereafter:

(Se non è presente alcun conflitto scriva "Nessuno", altrimenti descriva gli accordi/interessi finanziari con una o più organizzazioni che potrebbero essere percepiti come reali o apparenti conflitti di interesse in relazione ai contenuti del suo articolo.)

could be perceived as a real or apparent conflict of interest in the context of the subject of this article):	
NESSUNO	
Nome/Name LUIGI CINQUANTA	
Firma/Signature Data/Date 13 6 2016	

Per cortesia compili questo documento e lo carichi in Editorial Manager insieme al suo articolo.

Please fill in this document and upload it in Editorial Manager while submitting your manuscript.

Click here to view linked References

Percorso di laboratorio raccomandato nella diagnosi, prognosi e follow-up delle gammopatie monoclonali

Recommended laboratory path for the diagnosis, prognosis and follow up of monoclonal gammopathies.

Luigi Cinquanta¹, Marco Tani², Maria Concetta Sorrentino³, Maria Paola Simula⁴, Salvatore Mangraviti⁵, Bruno Milanesi⁶, Ignazio Brusca⁷

Per il gruppo di Studio SIPMeL Proteine

¹ Azienda Ospedaliera Universitaria, Salerno, Italia

² PO Gavardo-Salò (BS), Italia

³ ISMETT, Palermo, Italia

⁴Azienda Sanitaria Universitaria Integrata, Trieste, Italia

⁵ Ospedale Gaslini, Genova, Italia

⁶Azienda Ospedaliera, Desenzano sul Garda (BS), Italia

⁷ Ospedale Buccheri La Ferla FBF, Palermo, Italia

Riassunto In Italia, l'elevata prevalenza delle gammopatie monoclonali nella popolazione adulta e l'alta cadenza con la quale si richiede l'elettroforesi delle proteine sieriche, per svariate esigenze cliniche, determinano due conseguenze. Da una parte è relativamente frequente il riscontro occasionale nella storia di un individuo di una componente monoclonale (CM) sierica, dall'altra si rende necessario inquadrare correttamente i dati laboratoristici e programmare successivamente esami diagnostici mirati e appropriati. Il gran numero di lavori scientifici pubblicato a livello internazionale negli ultimi 15 anni, soprattutto da ematologi clinici, ha attribuito un'importanza determinante ai test di laboratorio nella gestione dei pazienti con gammopatie monoclonali, ma non sempre ha dato indicazioni univoche e coerenti sulla scelta dei test di laboratorio da praticare nelle diverse situazioni cliniche e sulle modalità di esecuzione e d'interpretazione degli stessi. A questo proposito, il Gruppo di Studio "Proteine" della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio (SIPMeL) ha considerato opportuno raccogliere in un documento una serie di "raccomandazioni" sull'utilizzo dei test di laboratorio, in particolare di quelli compresi nella disciplina Protidologia, nella diagnosi, prognosi e follow-up delle gammopatie monoclonali. In appendice vengono riportate note metodologiche riguardanti aspetti pre-analitici e analitici controversi, relativi all'esecuzione dei principali esami di laboratorio descritti nel testo.

Parole chiave Componente monoclonale · Gammopatia monoclonale · Mieloma multiplo · Elettroforesi

Summary In Italy, the high occurrence of monoclonal gammopathies in adults and the high frequency of requests for serum protein electrophoresis have two consequences. On one hand it is relatively frequent in a person's history to come across a serum monoclonal component; on the other it is necessary to correctly frame the laboratory data and, consequently, plan the appropriate targeted lab tests. In the last fifteen years, the international scientific publications (mainly by clinical hematologists) have shown the great importance of lab testing in the management of patients with monoclonal gammopathies. However these studies have not always given coherent and precise indications on the appropriate choice of laboratory tests in different clinical situations, or how to correctly perform and interpret them. In this regard, the Study Group "Proteins" of the Italian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine (SIPMeL) has collected in a document a series of "advices" on the use of laboratory tests in the diagnosis, prognosis and follow-up of monoclonal gammopathies, in particular those included in the branch that studies the plasma protein assays. The appendix shows methodological notes concerning controversial analytical and pre-analytical aspects of the execution of the main laboratory tests described in the paper.

 $\textbf{Keywords} \ \ \text{Monoclonal component} \ \cdot \ \ \text{Monoclonal gammopathy} \ \cdot \ \ \text{Multiple myeloma} \ \cdot \ \ \\ \text{Electrophoresis}$

Le gammopatie monoclonali costituiscono un gruppo eterogeneo di discrasie plasmacellulari caratterizzate dall'espansione di uno o più cloni cellulari con sintesi del relativo prodotto [1, 2] (componente M sierica e/o urinaria) [Fig. 1]. Normalmente, la produzione delle immunoglobuline è eterogenea (policionale), con ogni clone plasmacellulare secernente solo una catena pesante gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) o epsilon (ϵ) e una catena leggera kappa (κ) o lambda (λ) durante la sua vita. Di norma le catene leggere vengono prodotte in modico eccesso, per cui nelle urine delle persone sane si ritrovano piccole quantità di catene leggere (< 40 mg/24h). Il mieloma multiplo è una neoplasia dovuta alla proliferazione incontrollata di un clone di plasmacellule. Le plasmacellule si accumulano nel midollo osseo e producono in elevate quantità immunoglobuline tutte dello stesso tipo (componente monoclonale) [1]. Anche se oggi è poco noto, la proteina di Bence Jones è stata il primo marcatore tumorale misurabile nel Laboratorio clinico in pazienti con mieloma multiplo. Essa fu descritta per la prima volta nel 1847 dal medico inglese Henry Bence Jones e poi caratterizzata come una catena leggera immunoglobulinica libera monoclonale [3-5]. Oggi la proteina di Bence Jones e tutte le componenti monoclonali sono considerate marcatori proteici dal valore inestimabile per il rilevamento, la classificazione, la stadiazione e il monitoraggio delle discrasie plasmacellulari. La componente monoclonale è rapidamente rilevata come un alto picco simmetrico omogeneo, con mobilità di tipo α2, β o γ all'elettroforesi del siero o delle urine. Anche se la rilevazione della componente monoclonale è un indicatore chiave del mieloma multiplo, è importante ricordare che questa patologia rappresenta solo una parte di una grande famiglia di patologie proliferative delle plasmacellule: le discrasie plasmacellulari.

Epidemiologia delle gammopatie monoclonali

In Italia il mieloma multiplo rappresenta l'1,2% di tutti i tumori diagnosticati tra gli uomini e l'1,3% tra le donne con un'incidenza annuale media di 9,5 e 8,1 casi ogni 100.000. Le stime indicano un totale di 2315 nuovi casi diagnosticati ogni anno tra i maschi e di 2098 tra le femmine. Il mieloma multiplo è una patologia dell'età avanzata: infatti, l'età mediana alla diagnosi è di 68 anni, circa il 2% dei pazienti all'esordio ha meno di 40 anni, mentre il 38% dei pazienti ha un'età superiore a 70 anni [6]. Ben più alta è la prevalenza di gammopatie monoclonali nella popolazione generale; essa è valutata intorno all'1%, con maggiore rischio per il sesso maschile. Nelle classi di età più elevate può raggiungere il 9%; in uno studio di popolazione condotto negli Stati Uniti, l'incidenza di componenti monoclonali in soggetti sani di età maggiore di 50 anni è risultata pari al 3,2%, valore che raggiunge il 4,2% quando si considerano anche i casi di componenti monoclonali costituiti da sole catene leggere libere (free light chain, FLC). È da sottolineare che la frequenza di rinvenimento di componenti monoclonali aumenta nella popolazione anziana, i soggetti di età superiore agli 80 anni hanno un'incidenza di componenti monoclonali circa 4 volte maggiore rispetto ai più giovani [7]. In Italia, lo studio, che annovera il maggior numero di soggetti esaminati, mostra una prevalenza di componenti monoclonali del 2,9% in 35.000 soggetti ospedalizzati, età compresa da 11 a 75 anni [8]. Il miglioramento delle tecniche diagnostiche e l'innalzamento dell'età media della popolazione potrebbero spiegare in parte l'aumento dell'incidenza registrata negli ultimi decenni. La rilevanza epidemiologica del riscontro di una componente monoclonale nella popolazione generale ha generato un ampio dibattito scientifico sull'ipotesi di eseguire un'elettroforesi siero-proteica di screening per le gammopatie monoclonali, creando una questione ancora irrisolta, sull'età al di sopra della quale eseguire tale test di laboratorio e sulla frequenza consigliabile con cui ripeterlo.

Obiettivi del documento

L'elevata incidenza di componenti monoclonali nella popolazione adulta associata all'alta frequenza con la quale nella realtà nazionale, per svariate esigenze cliniche, si richiede l'elettroforesi delle proteine sieriche rendono ragione della necessità di sapere correttamente inquadrare i dati laboratoristici e programmare i successivi esami diagnostici in modo mirato e appropriato. Risulta essenziale perseguire l'appropriatezza prescrittiva dei test di laboratorio nella gestione dei pazienti dopo il rinvenimento di una gammopatia monoclonale, condizione che richiede necessariamente un follow-up attento e continuato nel tempo, indicando i corretti tempi di osservazione a seconda della classe di rischio di progressione osservata. L'obiettivo principale del presente documento è fornire indicazioni sul corretto percorso diagnostico di laboratorio sia al momento del primo riscontro di una componente monoclonale, quando è necessario operare un primo inquadramento diagnostico ed eventualmente prognostico (rischio di progressione), sia durante il monitoraggio clinicolaboratoristico del caso. Ulteriore obiettivo di questo documento è contribuire alla costruzione di un migliorato contesto culturale e operativo che comporti la riduzione del numero di visite specialistiche ematologiche per i pazienti con gammopatie monoclonali a basso rischio di progressione e la facilitazione dell'accesso alle visite ematologiche ai pazienti con gammopatia monoclonale associata a fattori di rischio di progressione.

Il riscontro della gammopatia monoclonale: ruolo del Laboratorio clinico

• In Italia il primo riscontro nella storia di un individuo di una componente monoclonale sierica è spesso occasionale, a seguito dell'esecuzione di un'elettroforesi siero-proteica, richiesta per le motivazioni più svariate che spesso non prevedono il sospetto di discrasia plasmacellulare. A questo proposito occorre

precisare che le finalità di questo documento non comprendono approfondimenti sull'appropriatezza della richiesta di elettroforesi sierica, che saranno rinviati a un altro documento. Di fronte al riscontro di una gammopatia monoclonale e in assenza di notizie cliniche il paziente va sottoposto a test di laboratorio di I livello e a una valutazione clinica, associata a un'accurata anamnesi, per procedere a un corretto e indispensabile inquadramento clinico [9]. Nessuna componente monoclonale può essere trascurata; anche le più piccole componenti devono essere valutate e studiate perché anche un piccolo clone di cellule B può sintetizzare un'immunoglobulina monoclonale, magari costituita da sole catene leggere libere, che può provocare gravi danni organici. Le malattie causate da catene leggere libere monoclonali comprendono l'amiloidosi AL, la malattia da deposizione di catene leggere, la crioglobulinemia e la sindrome POEMS (polineuropatia, organomegalia, endocrinopatie, componenti monoclonali e alterazioni della pelle). Le componenti monoclonali sieriche in queste patologie sono di solito molto piccole e non facilmente rilevabili. Tuttavia, l'identificazione accurata della componente monoclonale, la sua quantificazione e una corretta caratterizzazione della stessa sono essenziali, perché una diagnosi errata o un ritardo nella diagnosi può impedire il corretto trattamento del paziente e peggiorare l'esito della patologia [10, 11]. In linea generale, è da tenere presente che la presenza di una componente monoclonale può associarsi, oltre che al mieloma multiplo, anche ad altre patologie e situazioni cliniche quali:

 altri tumori di origine linfoide e mieloide (es. leucemia linfatica cronica/linfomi a basso grado, leucemia mieloide cronica, mielodisplasia);
 tumori solidi (es. carcinoma del colon e della mammella);

- malattie non neoplastiche (es. cirrosi epatica, sarcoidosi, morbo di Gaucher, pioderma gangrenoso);
- malattie autoimmuni (es. artrite reumatoide, miastenia gravis, malattia da crioagglutinine); malattie infettive (es. tubercolosi, infezioni virali, parassitosi);
- altre discrasie plasmacellulari (MGUS, morbo di Waldenström, amiloidosi, sindrome POEMS).
- Raccomandazione n. 1: A seguito dell'esame elettroforetico delle proteine sieriche, in tutti i soggetti nei quali si riscontra la presenza di una gammopatia monoclonale per la prima volta, si raccomanda che il Laboratorio svolga a cascata la serie di esami di approfondimento descritti successivamente; tra questi la scansione densitometrica della componente monoclonale e l'immunofissazione sierica giocano un ruolo preminente, per confermare, quantificare e caratterizzare la componente monoclonale. Tutte le componenti monoclonali devono essere oggetto di approfondimento diagnostico, anche le più piccole.

Gli esiti di tali esami consentiranno al medico curante di operare un primo inquadramento diagnostico e una valutazione del rischio di progressione in malattia conclamata. Nell'eventualità in cui il Laboratorio non possa autonomamente eseguire esami di approfondimento, esso deve associare al referto un commento interpretativo nel quale deve essere indicato dettagliatamente il percorso diagnostico ottimale. Successivamente, in presenza di una componente monoclonale, quantizzata e tipizzata, il medico curante decide, sulla base delle notizie cliniche in suo possesso, se richiedere esami di approfondimento per valutare eventuali fattori di rischio di progressione della patologia in mieloma multiplo e/o diagnosticare la presenza di eventuali danni d'organo (CRAB: iperalcemia, insufficienza renale, anemia, lesioni ossee). Recentemente sono stati proposti altri parametri aggiuntivi di valutazione che prevedono anche indagini non di laboratorio e

che sono indicate con l'acronimo SLIM: plasmacellule monoclonali midollari > 60%, > 1 lesione ossea focale di dimensioni maggiori di 5 mm con MRI, *involved/uninvolved FLC* $ratio \ge 100$ (valore calcolato utilizzando l'antisiero policlonale) [12].

Test di laboratorio per l'evidenziazione e l'inquadramento diagnostico delle gammopatie monoclonali al primo riscontro

- Raccomandazione n. 2: Per il rinvenimento delle componenti monoclonali e l'inquadramento diagnostico delle stesse rinvenute per la prima volta si raccomanda l'utilizzo dei seguenti test di laboratorio definiti di I livello, cinque tra questi trovano un posto di rilievo e sono compresi nell'ambito della diagnostica protidologica:
- siero-elettroforesi proteica (S-EF): rappresenta l'esame di elezione che consente il riconoscimento di una banda monoclonale, essendo in grado di rilevare l'omogeneità molecolare della proteina, e la quantificazione della componente monoclonale tramite densitometria. La tecnica misura la componente monoclonale per proporzione diretta con la concentrazione delle proteine totali sieriche, dopo delimitazione della banda monoclonale nel tracciato elettroforetico, e consente una sommaria valutazione della massa tumorale. La quantificazione della componente monoclonale è un parametro cardine per la gestione del paziente con componente monoclonale, in quanto in tutte le malattie secernenti è un indice della massa tumorale. La quantificazione della componente monoclonale è necessaria, inoltre, per la diagnostica differenziale delle gammopatie monoclonali, la stratificazione del rischio di progressione e la valutazione della risposta ai trattamenti [1, 13, 14].

• tipizzazione delle componenti monoclonali sieriche (S-IFE): può essere realizzata tramite immunofissazione su gel d'agarosio o per immunosottrazione con l'elettroforesi capillare. La scelta della metodologia analitica tiene conto di esigenze operative (es. ricerca d'automazione più o meno spinta) e cliniche (necessità di ottenere la massima sensibilità analitica). La S-IFE conferma la presenza delle componenti monoclonali e le caratterizza dal punto di vista immunologico con antisieri specifici anti-catene pesanti e leggere.

Raccomandazione n. 2: La tipizzazione delle componenti monoclonali deve essere eseguita al primo riscontro di una componente monoclonale, in quanto il tipo di immunoglobulina coinvolta fornisce informazioni essenziali non solo diagnostiche ma anche prognostiche.

• Dosaggio delle catene leggere libere sieriche o s-FLC (*Free Light Chains*, *FLC assay*): consente la valutazione della massa tumorale e del rischio di evoluzione attraverso la determinazione della concentrazione delle catene leggere libere circolanti nel siero, non complessate nell'immunoglobulina intatta, e la determinazione del FLC k/l *ratio*. I dosaggi in commercio non sono standardizzati, per cui il range di valori normali varia in dipendenza dell'antisiero, policlonale o monoclonale, utilizzato. Il dosaggio delle s-FLC associato a S-EF e S-IFE conferisce allo screening delle discrasie plasmacellulari una sensibilità diagnostica quasi assoluta e renderebbe inutile l'U-IFE sulle urine delle 24 ore, a eccezione del caso in cui si sospetti l'amiloidosi [15]. L'IMWG (*International Myeloma Working Group*) raccomanda il dosaggio delle s-FLC per l'inquadramento diagnostico dei pazienti nei quali venga rinvenuta una componente monoclonale [16]; la medesima raccomandazione viene successivamente ribadita nelle linee guida della *US National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) [17]. Il dosaggio delle catene leggere libere nel

siero gioca anche un importante ruolo nella definizione della prognosi e nel monitoraggio del trattamento dei pazienti con discrasie plasmacellulari [18, 21]. Infine, l'osservazione che nel mieloma micromolecolare il dosaggio nefelometrico delle FLC sieriche correla con le variazioni dell'escrezione urinaria delle FLC [21] suggerirebbe che la determinazione delle concentrazioni sieriche delle catene leggere libere possa costituire una valida alternativa alla problematica misura della proteinuria di Bence Jones (PBJ).

Raccomandazione n. 3:_Il dosaggio delle s-FLC deve essere eseguito per il corretto inquadramento diagnostico, la prognosi e il follow-up delle componenti monoclonali.

- Urine-elettroforesi proteica (U-EF) associata a proteinuria delle 24 ore: sono test utili per la valutazione della massa tumorale, della funzionalità renale e per distinguere tra il danno glomerulare e quello tubulare.
- Immunofissazione urinaria (U-IFE): evidenzia le componenti monoclonali nel tracciato di riferimento e le caratterizza. Alcuni schemi di classificazione e di stadiazione delle discrasie plasmacellulari, in particolare di quelle asintomatiche, e linee guida per il trattamento del mieloma multiplo comprendono tra i criteri decisionali la quantizzazione della PBJ [1, 17]. Tuttavia, nessuno di questi documenti specifica le modalità con le quali misurare la PBJ quantitativamente [23, 24]; le rilevanti criticità preanalitiche e analitiche relative alla misura quantitativa della PBJ verranno approfondite in seguito. La ricerca di PBJ, quindi, va eseguita nello screening delle discrasie plasmacellulari soprattutto quando si sospetti un'amiloidosi AL o quando persista il sospetto clinico di gammopatia monoclonale e gli esami su siero siano negativi; inoltre, è uno degli esami da eseguire alla diagnosi di gammopatia monoclonale e nella verifica della risposta alla terapia nel mieloma multiplo e nell'amiloidosi AL [1, 25, 26].

Raccomandazione n. 4: L'esecuzione della U-IFE per la ricerca della PBJ va eseguita nel sospetto diagnostico di una discrasia plasmacellulare, in fase d'inquadramento diagnostico di gammopatia monoclonale rinvenuta casualmente e nella valutazione della risposta in corso di trattamento terapeutico.

Altri test di laboratorio considerati di I livello utili per l'inquadramento diagnostico di una componente monoclonale: in presenza di una componente monoclonale il medico curante può decidere, sulla base delle notizie cliniche in suo possesso, di richiedere esami di approfondimento per diagnosticare la presenza di eventuali danni d'organo, importanti per la valutazione della progressione della gammopatia monoclonale nel mieloma multiplo. Particolarmente importanti sono i test di laboratorio destinati a valutare i cosiddetti sintomi CRAB (iperalcemia, insufficienza renale, anemia, lesioni ossee) [12]:

- dosaggio delle immunoglobuline IgG, IgA e IgM nel siero: consente la valutazione della riduzione delle classi Ig non coinvolte (immunoparesi);
- emocromo: per la valutazione di eventuali citopenie;
- calcemia: per la valutazione del danno osseo;
- creatinina: per la valutazione della funzionalità renale;
- **esame standard delle urine e proteinuria** sulle urine delle 24 ore, in caso di positività per la ricerca delle proteine all'esame chimico-fisico delle urine: per la valutazione del danno renale.

Nel caso di una componente monoclonale di tipo IgM, frequentemente correlata a patologie linfoproliferative quali linfomi a basso grado, LLC e malattia di Waldenström (MW), sarà

utile integrare l'inquadramento con esami ematici e radiologici *ad hoc*. Qualora la componente monoclonale fosse tipizzata come IgG, IgA o come sola catena leggera (k o λ) il paziente dovrà eseguire esami diagnostici di II livello, tra i quali il mieloaspirato/biopsia osteomidollare (BOM), che permettono una diagnosi differenziale, in accordo con l'IMWG, tra diverse situazioni cliniche: MGUS, plasmocitoma solitario, mieloma multiplo asintomatico e mieloma multiplo sintomatico [1, 27, 28]. Nella Tabella 1 sono riportati i criteri necessari per la diagnosi differenziale tra MGUS, mieloma multiplo e mieloma asintomatico.

Il Laboratorio clinico nelle diverse discrasie plasmacellulari

Gammopatia monoclonale d'incerto significato (MGUS)

Definizione e classificazione

La diagnosi di MGUS è spesso fortuita, in corso di esami ematici di controllo, in assenza di segni e sintomi sistemici. Al fine di confermare la diagnosi di MGUS, in questi soggetti vanno eseguite indagini diagnostiche atte a escludere altre situazioni cliniche correlate alla presenza di componente monoclonale. Attualmente sono distinti tre tipi di MGUS in base alla sua costituzione: non IgM, IgM, e componente monoclonale costituita da sole catene leggere. I criteri per la definizione di MGUS prevedono per le classi IgG e IgA la presenza di una componente monoclonale < 3,0 g/dl, una percentuale di plasmacellule midollari inferiore al 10% e l'assenza clinica di segni o sintomi riconducibile al mieloma quali l'ipercalcemia, l'insufficienza renale, l'anemia e la presenza di lesioni ossee [29, 30]. Più controversa è la definizione della MGUS di classe IgM: secondo i criteri della Mayo Clinic vanno utilizzati gli stessi criteri quantitativi relativi alle IgG e IgA, mentre il 2nd

International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia stabilisce che la MGUS IgM venga definita dalla sola presenza della componente monoclonale di classe IgM, anche in assenza di infiltrazione midollare, non tenendo in alcun conto il dato quantitativo [31, 32].

Progressione delle MGUS

Nella maggior parte dei casi di MGUS, il quadro midollare e sierologico rimane invariato nel tempo. In alcuni casi, a seguito di ulteriori mutazioni genetiche, si osserva invece un'evoluzione del quadro clinico da condizione asintomatica a patologia neoplastica attiva (mieloma multiplo o morbo di Waldenström), con un aumento della componente monoclonale e delle plasmacellule midollari, responsabili della comparsa dei sintomi clinici caratteristici. La MGUS non richiede alcun trattamento, ma unicamente controlli periodici atti a valutarne l'evoluzione nel tempo, con un programma di follow-up periodico, la cui frequenza varia in base all'entità della componente monoclonale e alla presenza di specifici fattori di rischio. La MGUS può anche scomparire nel siero. Questo fenomeno riguarda il 2-5% delle componente monoclonale soprattutto di classe IgM a bassa concentrazione e spesso segue allo stop di una terapia immunosoppressiva o all'instaurarsi di una terapia antimicrobica. La MGUS è associata a un basso ma continuo rischio di progressione verso patologie evolutive (~1% l'anno) ed è, pertanto, considerata una condizione di premalignità. Il rischio è maggiore per le MGUS di classe IgA o IgM, rispetto alle IgG [29, 33-36]. Notevolmente inferiore è il rischio progressivo delle MGUS costituite da sole catene leggere che si attesta mediamente intorno allo 0,27% anno [37, 38]. Indici di rischio sono considerate la produzione di FLC [35, 39, 40] e la presenza della PBJ [34]. Ulteriori informazioni sul rischio di progressione possono essere ottenuti con la citometria a flusso, con il riscontro di aneuploidia del DNA o l'evidenza di soppressione delle plasmacellule non

clonali [41-45]. Il rischio evolutivo delle MGUS è attualmente stratificato sulla base di tre fattori, tutti test di laboratorio. Sono fattori di rischio:

- gli isotipi di componente monoclonale IgA e IgM;
- l'entità della componente monoclonale > 1,5 g/dl;
- l'alterazione del rapporto delle catene leggere K/L libere nel siero (Tab. 2).

I pazienti vengono quindi definiti a:

- basso rischio (nessun fattore presente);
- rischio basso-intermedio e intermedio-alto (1-2 fattori);
- alto rischio (3 fattori).

Il rischio di progressione a 20 anni varia dal 5% dei pazienti a basso rischio (score = 0) al 58% nei pazienti ad alto rischio (score = 3) [29, 35-36].

Raccomandazione n. 5: Il dosaggio immunochimico delle s-FLC va eseguito nel paziente con MGUS principalmente al primo riscontro della componente monoclonale per la stratificazione del rischio di progressione.

Nei pazienti a basso rischio alla diagnosi non è raccomandata l'esecuzione di una valutazione midollare e radiologica dello scheletro; queste ultime sono rimandate al momento in cui si osserva un cambiamento rilevante del quadro clinico e di laboratorio o sono riservate a casi selezionati. Esami del midollo ed esami radiologici vanno seguiti annualmente nei pazienti a rischio medio-alto [27, 28, 35, 46].

Raccomandazione n. 6: Nei pazienti a basso rischio (componente monoclonale < 1,5 g/dl; Isotipo IgG; FCL ratio normale) il follow-up va condotto esclusivamente eseguendo

l'elettroforesi delle sieroproteine, con la quantificazione della componente monoclonale, a 6 mesi (per 2 volte consecutive nell'arco dei primi 12 mesi) e ogni 2-3 anni o quando si presentano sintomi associabili a una progressione maligna. Viene considerato inappropriato, inoltre, ripetere l'immunofissazione sierica se non cambia il pattern elettroforetico della S-EF. Nei pazienti a rischio intermedio (1-2 FR) o alto (3 FR) il follow-up raccomandato, sempre imperniato sull'esecuzione della S-EF, sarà a 6 mesi con ricontrollo a 6 mesi e poi annualmente se il quadro è stabile. In questi pazienti bisognerà prevedere l'esecuzione di altri test di laboratorio in aggiunta ai precedenti, quali aspirato midollare, BOM ed esami di citogenetica (FISH) a scopo prognostico.

Raccomandazione n. 7: Nei pazienti con elevati livelli di catene leggere libere va eseguito durante il follow-up il dosaggio dell'albumina urinaria e dei livelli sierici di NT-ProBNP al fine di evidenziare lo sviluppo di amiloidosi e di eventuali danni d'organo (rene e cuore) conseguenti alla deposizione di catene leggere.

MGUS e neoplasie

I paziente con MGUS presentano un rischio fino a 8 volte superiore rispetto al resto della popolazione di sviluppare nel tempo neoplasie delle cellule del sangue come la leucemia mieloide acuta, la policitemia vera e le sindromi mielodisplastiche, e di circa 1,5 volte superiore di sviluppare tumori solidi. Il rischio maggiore è determinato soprattutto nei pazienti nei quali si riscontrano gli isotipi IgG e IgA; esso sembra indipendente dal tempo del riscontro

della MGUS ed è maggiormente legato a una quantità di componente monoclonale > 1,5 mg/dl [47-49].

Mieloma multiplo asintomatico (smouldering)

La definizione di mieloma multiplo asintomatico descrive un paziente con mieloma multiplo (componente monoclonale sierica ≥ 3 g/dl o componente monoclonale urinaria ≥ 500 mg/24 h e/o plasmacitosi midollare compresa tra 10% e 60%) in assenza di segni e sintomi attribuibili alla patologia stessa (sintomi d'organo CRAB) [1, 27, 28, 50, 51]. Nella Tabella 3 sono riportati dettagliatamente i cosiddetti sintomi CRAB. Il rischio di progressione del mieloma multiplo asintomatico in mieloma multiplo sintomatico o amiloidosi AL è di circa il 10% l'anno per i primi 5 anni dopo la diagnosi, circa il 3% l'anno per i successivi 5 anni e l'1% l'anno per gli ulteriori 10 anni. La probabilità cumulativa di progressione è del 73% a 15 anni. La popolazione di pazienti affetti da mieloma multiplo asintomatico è molto eterogenea in quanto include pazienti a basso rischio evolutivo, che al pari delle MGUS non richiedono trattamento per molti anni, e pazienti che, al contrario, evolvono in mieloma sintomatico in un tempo breve. Per questi pazienti viene consigliata una sorveglianza clinico-strumentale ravvicinata [1, 46] per evidenziare precocemente un'eventuale evoluzione a malattia sintomatica [34, 52-55]. La presenza dei segni SLIM è considerata predittiva del rischio di evoluzione a mieloma sintomatico e, in questo caso, il paziente con mieloma multiplo può essere precocemente trattato con esiti significativamente favorevoli, prima della comparsa dei segni di danno d'organo [40, 56-58].

Raccomandazione n. 8: La S-EF, con la quantificazione della componente monoclonale, costituisce il test di laboratorio cardine per il monitoraggio del mieloma multiplo

asintomatico; la frequenza dei controlli è ogni 2-3 mesi per il primo anno, ogni 4-6 mesi per il secondo anno e ogni 6-12 mesi negli anni successivi. Controlli più ravvicinati sono raccomandati in caso di aumentato rischio di evolutività [27, 56].

Raccomandazione n. 9: Il dosaggio delle s-FLC, con il calcolo del ratio involved/uninvolved FLC, deve essere eseguito per individuare i pazienti con mieloma multiplo asintomatico da sottoporre a trattamento terapeutico.

Mieloma multiplo

Alle caratteristiche cliniche e diagnostiche di laboratorio proprie del mieloma multiplo, in questi pazienti si associano uno o più segni clinici di malattia attiva [28]. La maggior parte dei casi esordisce come mieloma multiplo *de novo*, anche se sembra possibile postulare, virtualmente in tutti i pazienti, una precedente fase di MGUS [59]. La diagnosi di mieloma multiplo si basa sull'evidenza di tre elementi: una componente monoclonale a livello sierico e/o urinario, un aumento delle plasmacellule a livello midollare e il danno d'organo correlato alla proliferazione plasmacellulare [28]. Nel paziente con mieloma multiplo sintomatico, andranno eseguite indagini di laboratorio di approfondimento, esami di II livello (Tab. 4), che possono aiutare il clinico nel corretto inquadramento diagnostico e prognostico della patologia. Per la definizione prognostica, viene eseguita una stadiazione di malattia seguendo i criteri di Durie e Salmon [55] o recentemente dell'*International Staging System* (ISS) [60] (Tab. 5). Il sistema ISS, basato esclusivamente su parametri di laboratorio quali la beta 2-microglobulina e l'albumina sierica, risulta più semplice da utilizzare rispetto ai criteri di Durie e Salmon.

Raccomandazione n. 10: La stadiazione prognostica dei pazienti affetti da mieloma multiplo implica l'esecuzione dei dosaggi sierici di beta 2-microglobulina e albumina.

Infine, una corretta valutazione della risposta al trattamento è essenziale nella gestione dei pazienti con mieloma multiplo. Gran parte dei criteri di risposta al trattamento proposti nel 2006 dall'IMWG e aggiornati nel 2015 sono definiti in base all'esito di indagini di laboratorio descritti nella Tabella 6 [58]. Non risulta sufficiente la scomparsa della componente monoclonale nella S-EF per attestare come completa la risposta al trattamento; è necessario che anche la ricerca di componenti monoclonali con S-IFE ed U-IFE risulti negativa. Per definire una risposta al trattamento completa e stringente è necessaria anche la normalizzazione delle s-FLC [13, 58]. I criteri IMWG dovrebbero essere utilizzati per valutare la risposta ogni 30-60 giorni nel corso del trattamento terapeutico. Durante il corso del mieloma multiplo possono comparire componenti monoclonali con un isotipo diverso rispetto alla componente monoclonale della malattia di base. I dati sulla frequenza in cui questa evenienza può essere riscontrata variano tra il 10% e il 73% nei pazienti trapiantati e tra 1,6% e 33% nei non trapiantati. Le componenti monoclonali secondarie, spesso transitorie, vanno differenziate da eventuali recidive della malattia di base. La presenza di MGUS secondaria sembrerebbe un segno prognostico favorevole, sebbene non vi sia totale accordo tra i vari studi [61-66].

Raccomandazione n. 11: Nei pazienti con mieloma multiplo, devono essere utilizzati i test di immunofissazione sierica e urinaria, in aggiunta all'elettroforesi proteica sierica, e il dosaggio delle s-FLC per valutare la risposta al trattamento terapeutico.

Note metodologiche

L'elettroforesi delle sieroproteine è richiesta principalmente per la ricerca delle componenti monoclonali, ma può essere utilizzata in diverse situazioni cliniche quali la sindrome nefrosica, l'insufficienza renale cronica, la malnutrizione, le epatopatie. In questi casi, il riscontro di componenti monoclonali è tipicamente occasionale, indipendentemente dalla procedura analitica utilizzata.

Identificazione delle componenti monoclonali sieriche

Le metodiche analitiche attualmente utilizzate e raccomandate sono due: l'elettroforesi classica su gel di agarosio (AGE) e l'elettroforesi capillare (CE). Il primo metodo, che si basa sull'originario principio di Tiselius, utilizza una colorazione del gel che permette sia l'ispezione visiva del tracciato di migrazione sia la quantizzazione densitometrica delle componenti monoclonali. Nell'elettroforesi capillare la separazione delle proteine avviene facendo migrare il siero all'interno di un piccolo capillare di silice fusa riempito con un elettrolita. La misura delle proteine è effettuata all'estremità anodica del capillare tramite spettrometria di assorbimento a una lunghezza d'onda di 185-200 nm, valutando quindi il legame peptidico. Qualunque sia la tecnica prescelta (gel di agarosio o elettroforesi capillare) è importante che il metodo adottato sia a elevata risoluzione, ovvero che raggiunga una sensibilità < 0,1 g/dl nell'identificare una componente monoclonale. Dal punto di vista delle prestazioni analitiche generalmente l'elettroforesi capillare è ritenuta leggermente più sensibile e meno specifica [67-69], anche se questi dati vanno rapportati alla classe della componenti monoclonali indagata, in quanto è riportato che l'elettroforesi capillare risulti essere meno sensibile per le componenti monoclonali di classe IgM [70-72]. È stato riportato che l'elettroforesi capillare può portare a false diagnosi di componente monoclonale o di

ipergammaglobulinemia policionale per l'interferenza nella lettura UV di sostanze iniettate al paziente, quali mezzi di contrasto, antibiotici o plasma expanders [73-76].

Quantificazione delle componenti monoclonali

I risultati ottenuti dalle metodiche protidoforetiche sono usualmente rapportati al livello delle proteine totali; in questo modo, dopo l'identificazione di una componenti monoclonali all'ispezione visiva, la scansione densitometrica permette di avere informazioni quantitative riguardanti la componenti monoclonali stessa [51, 77-79]. La quantificazione del picco monoclonale, ottenuta tramite rapporto percentuale tra l'area sottesa sotto la curva e la concentrazione delle proteine totali, è una misura da ritenere non adeguatamente accurata e soggettiva. L'inaccuratezza della misura è legata alle problematiche analitiche relative alla diversa affinità che le proteine sieriche hanno per i vari coloranti utilizzati in elettroforesi su gel o alla possibile presenza di farmaci, assunti dal paziente, che vengono rilevati nella misura spettrofotometrica della capillare. La soggettività di valutazione della componente monoclonale, insita nella procedura stessa che prevede che sia l'operatore a fissarne i "minimi" [81-84], è alla base del motivo per il quale si suggerisce al paziente di recarsi sempre nello stesso Laboratorio in caso di monitoraggio di discrasia plasmacellulare. Per le bande che migrano in zona gamma, la soppressione della quota policionale che accompagna spesso la componente monoclonale rende sufficientemente precisa la misura ai fini di una valutazione clinica del tumore. Nei casi in cui sia impossibile applicare tale procedura, o per l'esigua quantità della componente monoclonale oppure per la co-migrazione della componente monoclonale con la transferrina o con il C3, l'unica possibilità di ottenere un dato quantitativo, ancorché non accurato, è data dalla nefelometria o dalla turbidimetria. Il dosaggio delle immunoglobuline con queste metodiche non distingue tra la quota

monoclonale e la quota policionale della classe dosata e tende a sovrastimare le componenti monoclonali, in particolare quelle costituite da IgM [51, 80, 85]. Nel caso di piccole componenti monoclonali la quota policionale può portare a un notevole errore di stima della proteina monoclonale. L'errore inizia a diventare significativo con componenti monoclonali al di sotto di 1,0 g/dl. Non vi sono linee guida internazionali che suggeriscano le modalità da seguire quando la componente monoclonale è inferiore a 1,0 g/dl. Per piccole componenti monoclonali situate completamente in zona gamma, Schild et al. hanno implementato sull'analizzatore Capillarys della Sebia la possibilità di tracciare una linea tangente alla componente monoclonale che separa questa dalla quota policionale, con vantaggi in termini di accuratezza e riproducibilità della misura [86]. Analoghi procedimenti software sono stati implementati su altri analizzatori per elettroforesi sieroproteica. Questo approccio non è efficace in frazioni diverse dalla gamma. Per le componenti monoclonali presenti in queste zone, è stato suggerito di farsi guidare dall'immunosottrazione per individuare il punto esatto in cui effettuare la separazione del picco monoclonale dal resto delle proteine comigranti con risultati simili a quelli ottenuti da Schild [87, 88]. Nell'eventualità di componenti monoclonali di classe IgM va considerata l'ipotesi che possano essere presenti crioglobuline, infatti in questo caso i dati quantitativi ottenuti molto probabilmente sono errati. Nel caso di componente monoclonale costituita da IgA, in alternativa al dosaggio quantitativo nefelometrico delle IgA totali [89], è stato proposto il dosaggio nefelometrico accoppiato delle heavy-light chain κ e λ. Per quanto riguarda il dosaggio accoppiato delle heavy-light chain κ e λ, il loro utilizzo è recente; non vi è ancora completo accordo sulla loro effettiva utilità e sono necessarie ulteriori esperienze per comprenderne l'effettivo valore clinico [90-94]. Nel dosaggio delle componenti monoclonali ad alte concentrazioni esistono notevoli discrepanze tra AGE e CE e la densitometria eseguita su gel d'agarosio tende a sottostimare le misure [95, 96]. Un promettente approccio nella rilevazione delle piccole componenti

monoclonali si basa sull'utilizzo della spettrometria di massa. La metodologia analitica si è mostrata dotata di notevole sensibilità, ma è ancora confinata nell'ambito di pochi studi, senza alcuna implementazione pratica [97, 98].

Raccomandazione n. 12: La quantità di componente monoclonale, ottenuta con la scansione densitometrica, va espressa nel referto in g/dl, e sono da evitare le indicazioni con aggettivi quantitativi per indicare la sua concentrazione. Allo stato attuale delle conoscenze e delle possibilità analitiche dei Laboratori, suggeriamo nel caso di componenti monoclonali piccole o non migranti in zona gamma di ritenere utilizzabile il dosaggio nefelometrico o turbidimetrico, tenendo conto comunque che esso include anche la quota policlonale dell'immunoglobulina dosata [13, 99].

Caratterizzazione delle componenti monoclonali

Da diversi anni sono disponibili due metodi per la caratterizzazione delle componenti monoclonali sieriche. L'immunofissazione, su gel di agarosio, e l'immunosottrazione in elettroforesi capillare. Dal punto di vista analitico l'immunosottrazione risulta meno sensibile rispetto all'immunofissazione. In particolare l'immunofissazione su gel di agarosio può arrivare a rilevare componenti monoclonali fino a 0,1 g/dl, mentre l'immunosottrazione si ferma a 0,25 g/dl. L'immunosottrazione ha difficoltà nel caratterizzare componenti monoclonali costituite da sole catene leggere o componenti monoclonali intere di modeste quantità, soprattutto in presenza di bande oligoclonali [67-69, 100, 101]. La concordanza tra i due metodi varia notevolmente in rapporto alla concentrazione delle immunoglobuline e

all'esperienza dell'operatore [67, 69, 102-104]. L'immunofissazione rimane quindi la metodica di riferimento, ma gli indubbi vantaggi di velocità e facilità di esecuzione dell'immunosottrazione pongono quest'ultima come metodica alternativa a eccezione delle situazioni nelle quali la componente monoclonale appare nel tracciato protidoforetico piccola o di interpretazione problematica. In questi ultimi casi può essere alternativamente utilizzato l'isoelettrofocusing, normalmente dedicato alla diagnostica liquorale, che ha un limite di rilevazione di 0,01 g/L per le componenti monoclonali costituite da IgG [105].

L'immunofissazione va eseguita con gli antisieri anti catene pesanti G, A, M e con gli antisieri anti-catene leggere κ e λ totali. Nel caso non si riuscisse a identificare la catena pesante, il test va ripetuto con antisieri anti-IgD e anti-IgE.

A proposito di questa eventualità, l'immunosottrazione non è in grado di identificare le componenti monoclonali costituite da IgD e IgE, per cui l'immunofissazione rimane l'unica metodica utilizzabile. Per la minore sensibilità analitica, inoltre, si sconsiglia l'utilizzo della metodica d'immunosottrazione per attestare l'assenza di componenti monoclonali in corso di valutazione dell'efficacia del trattamento terapeutico.

Dosaggio della proteinuria di Bence Jones

Per definizione la PBJ è data dalla presenza nelle urine di catene leggere immunoglobuliniche libere monoclonali. L'approccio più frequente nella ricerca della PBJ è basato sull'elettroforesi delle proteine urinarie seguita nei casi positivi dall'immunofissazione urinaria. Nella scelta della procedura analitica di screening è da considerare un limite inferiore di rilevazione di 10 mg/L [24, 106-108], per cui potrebbe essere necessario concentrare le urine. Utilizzando l'elettroforesi delle proteine urinarie è da tenere presente che la presenza di

proteinuria può mascherare la PBJ, in particolare nelle proteinurie di tipo misto. Solo l'immunofissazione urinaria può evidenziare la presenza della PBJ nelle urine. Di converso i pazienti con proteinuria di tipo tubulare, specialmente se le urine sono concentrate, possono fornire un quadro di falsa positività per la PBJ [109-114]. L'American College of Pathologists raccomanda di effettuare la ricerca della PBJ su un campione di urine delle 24h [9]. Non vi è piena condivisione su questo aspetto, sia per le note difficoltà insite nella raccolta delle urine delle 24 ore, sia per la crescita batterica sul campione urinario che potrebbe degradare la componente monoclonale. Per questo motivo è stato proposto di utilizzare per la ricerca della PBJ il campione di urine del secondo mitto del mattino, esprimendo i risultati rapportati alla creatinina, o in alternativa l'aggiunta alle urine delle 24h di un antibatterico (1 g/L di sodio azide). Per quanto riguarda la quantizzazione della PBJ e il monitoraggio del paziente affetto da mieloma vi è pieno accordo sull'utilizzo delle urine 24h [1, 13, 16, 115]. Il dosaggio nefelometrico urinario delle catene leggere delle Ig porta a una notevole sovrastima per cui, nonostante i suoi limiti, il dosaggio va eseguito con metodo densitometrico [24]. Il risultato quantitativo va espresso in mg/L ed è ricavato per proporzione diretta con la concentrazione della proteinuria totale, dopo delimitazione della banda monoclonale nel tracciato elettroforetico. I metodi di dosaggio della proteinuria totale presentano differenze nella rilevazione delle proteine di provenienza tubulare o glomerulare con notevoli conseguenze, pertanto, nel calcolo della quantità di PBJ escreta. Per questo motivo i clinici dovrebbero richiedere il dosaggio della PBJ sempre allo stesso Laboratorio. L'immunofissazione dovrebbe essere effettuata utilizzando antisieri anti-catene κ e λ . Il costo e le caratteristiche di sensibilità degli antisieri anti-κ e λ free ne suggeriscono l'utilizzo solamente quando è necessario evidenziare che si tratti di catene leggere libere. È opportuno a questo scopo valutare contemporaneamente la presenza di positività per le catene pesanti.

Raccomandazione n. 13: La ricerca della proteinuria di Bence Jones deve essere richiesta nel sospetto clinico di discrasia plasmacellulare e va eseguita sempre al riscontro di una componente monoclonale su siero. La U-IFE è il metodo di riferimento per la ricerca della proteinuria di Bence-Jones (PBJ); solo con essa vengono riconosciute le catene leggere libere monoclonali, escludendo le catene leggere legate alle pesanti. È stato proposto da varie associazioni scientifiche, con argomentazioni diverse ma ugualmente valide, di utilizzare le urine delle 24, le urine del primo mitto e quelle del secondo mitto, tuttavia in mancanza di evidenze sull'effettiva superiorità di un campione rispetto agli altri riteniamo che le tre modalità possano essere utilizzate, ripetendo il test se il risultato non appare congruente rispetto al quadro clinico o agli altri dati di laboratorio. In caso di richiesta di ricerca quantitativa della proteinuria di Bence Jones, essa va dosata con metodo densitometrico sulle urine delle 24 ore.

Ringraziamenti

Hanno collaborato alla realizzazione di questo documento, partecipando alla revisione del lavoro, i seguenti componenti del Gruppo di Studio Proteine della Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio:

Dott.ssa Fiorella Bottan, Azienda Ospedaliera San Giovanni Addolorata, Roma, Italia

Dott.ssa Isabella Oliviero, Marilab, Roma, Italia

Conflitti di interesse Nessuno

Studi condotti su esseri umani e animali: per questo tipo di studio non è richiesto l'inserimento di alcuna dichiarazione relativa agli studi effettuati su esseri umani e animali.

Consenso informato: per questo tipo di studio non è richiesto l'inserimento di alcuna dichiarazione relativa al consenso informato.

Bibliografia

- 1. International Myeloma Working G (2003) Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. Br J Haematol 121:749-757
- 2. Durie BG, Salmon SE (1975) A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. Cancer 36:842-854
- 3. Jones HB (1848). On a new substance occurring in the urine of a patient with mollitiesossium. Philosophical Transactions of the Royal Society 138:55-62
- 4. Edelman GM, Gally JA (1962) The nature of Bence Jones protein: chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal γ globulins. J Exp Med 116:202-227
- 5. Solomon A (1986) Light chains immunoglobulin. Structural-genetic correlates. Blood 68:603-610
- 6. AIRTUM Working Group (2011) I tumori in Italia. Rapporto 2011: La sopravvivenza dei pazienti oncologici in Italia. Epidemiol Prev 35 5-6 (S.3):1-200
- 7. Kyle RA Rajkumar SV (2006) Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Br J Haematol 134:573-589
- 8. Aguzzi F, Bergami MR, Gasparro C et al (1992) Occurence of monoclonal components in general practice: clinical implications. Eur J Haematol 48:192-195
- 9. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA et al (1999) Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. Arch Pathol Lab Med 123:106-107
- 10. Milani P, Palladini G, Graziani MS, Merlini G (2013) Componenti monoclonali piccole ma dannose. Biochimica Clinica 37:431-434
- 11. Merlini G (2012) Perchè è importante identificare e segnalare le piccole componenti monoclonali. Biochimica Clinica 36:25-28
- 12. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A et al (2014) International Myeloma Working group criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol 15:e538-e548
- 13. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS et al (2006) International uniform response criteria for multiple myeloma. Leukemia 20:1467-1473

- 14. Munshi NC, Anderson KC, Bergsagel PL et al. (2011) Consensus recommendations for risk stratification in multiple myeloma: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 2. Blood 117:4696-4700
- 15. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G et al (2009) International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. Leukemia 23:215-224
- 16. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP et al (2011) Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. Blood 117: 4701–4705
- 17. NCCN Guidelinees. Multiple Myeloma. Version 3/2016. www.nccn.org/patients (Accesso: agosto 2016)
- 18. Kyrtsonis MC, Vassilakopoulos TP, Kafasi N et al (2007) Prognostic value of serum free light chain ratio at diagnosis in multiple myeloma. Br J Haematol 137:240–243
- 19. Iwama KI, Chihara D, Tsuda K et al (2012) Normalization of free light chain kappa/lambda ratio is a robust prognostic indicator of favorable outcome in patients with multiple myeloma. Eur J Haematol 90:134-141
- 20. Snozek CL, Katzmann JA, Kyle RA et al (2008) Prognostic value of the serum free light chain ratio in newly diagnosed myeloma: proposed incorporation into the international staging system. Leukemia 22:1933-1937
- 21. Sthaneshwar P, Nadarajan V, Maniam JA et al (2009) Serum free light chains: diagnostic and prognostic value in multiple myeloma. Clin Chem Lab Med 47:1101-1107
- 22. Graziani MS, Merlini GP, Petrini C (2001) Linee guida per la ricerca della proteina di Bence Jones. Gruppo di Studio Proteine Società Italiana di Biochimica Clinica. Biochim Clin 25:23-32
- 23. Abraham RS, Clark RJ, Bryant SC et al (2002) Correlation of serum immunoglobulin free light chain quantification with urinary Bence Jones protein in light chain myeloma. Clin Chem 48:655-657
- 24. Graziani MS, Merlini GP, Petrini C; IFCC Committee on Plasma Proteins and the SIBioC Study Group on Proteins (2003) Guidelines for the analysis of Bence Jones Protein. Clin Chem Lab Med 41:338-346
- 25. Kyle RA (1999) Sequence of Testing for Monoclonal Gammopathies. Arch Pathol Lab Med 123:114-118
- 26. Bird JM, Owen RG, D'Sa S et al (2014) Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma. http://www.bcshguidelines.com (Accesso: agosto 2016)
- 27. Kyle RA, Durie BG, Rajkumar SV et al (2010) Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus

 perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. Leukemia 24:1121-1127

- 28. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A et al (2014) International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. Lancet Oncol 15:e538-e548
- 29. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV (2002) A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. N Engl J Med 346:564-569
- 30. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al (2006) Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. N Engl J Med 354:1362-1369
- 31. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A et al (2003) Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. Semin Oncol 30:110-115
- 32. Rajkumar SV, Kyle RA, Buadi FK (2010) Advances in the Diagnosis, Classification, Risk Stratification, and Management of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: Implications for Recategorizing Disease Entities in the Presence of Evolving Scientific Evidence Mayo Clin Proc 85:945-948
- 33. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al (2004) Long-term follow-up of 241 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance: the original Mayo Clinic series 25 years later. Mayo Clinic Proc 79:859-866
- 34. Cesana C, Klersy C, Barbarano L et al (2002) Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undeterminated significance and smoldering myeloma. J Clin Oncol 20:1625-1634
- 35. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM et al (2005) Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. Blood 106:812-817
- 36. Rosinol L, Cibeira MT, Montoto S et al (2007) Monoclonal gammopathy of undetermined significance: predictors of malignant transformation and recognition of an evolving type characterized by a progressive increase in M protein size. Mayo Clin Proc 82:428-434
- 37. Dispenzieri A, Katzmann JA, Kyle RA et al (2010) Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. Lancet 15:1721-1728
- 38. Eisele L, Dürig J, Hüttmann A et al (2012) Heinz Nixdorf Recall Study Investigative Group Prevalence and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance and lightchain MGUS in Germany. Ann Hematol 91:243-248
- 39. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM et al (2004) Presence of monoclonal free light chains in the serum predicts risk of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. Br J Haematol 127:308-310

- 40. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A et al (2013) Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. Leukemia 4:941-946
- 41. Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G et al (2007) New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. Blood 110:2586-2592
- 42. Rossi F, Petrucci MT, Guffanti A et al (2009) Proposal and validation of prognostic scoring systems for IgG and IgA monoclonal gammopathies of undetermined significance. Clin Cancer Res 15:4439-4445
- 43. Paiva B, Vidriales MB, Pérez JJ et al (2009) GEM (Grupo Español de MM) cooperative study group; PETHEMA (Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatías Malignas) cooperative study group. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. Haematologica 94:1599-1602
- 44. Pérez-Persona EL, Mateo G, García-Sanz R et al (2010) Risk of progression in smouldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: comparative analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. Br J Haematol 148:110-114
- 45. Paiva B, Almeida J, Pérez-Andrés M et al (2010) Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. Cytometry B Clin Cytom 78:239-252
- 46. Bird J, Behrens J, Turesson L (2009) UK myeloma forum (UKMF) and Noerdic Myeloma Study Group (NMSG): guidelines for investigational of newly detected M-Proteins and the management of monoclonal gammopathy of undeterminated significance (MGUS). Br J Haematol 147:22-42
- 47. Gregersen H, Mellemkjaer L, Ibsen JS et al (2001) The impact of M-component type and immunoglobulin concentration on the risk of malignant transformation in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. Haematologica 86:1172-1179
- 48. Mailankody S, Pfeiffer RM, Kristinsson SY et al (2011) Risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes after multiple myeloma and its precursor disease (MGUS). Blood 118:4086-4092
- 49. Roeker LE, Larson DR, Kyle RA et al (2013) Risk of acute leukemia and myelodysplastic syndromes in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS): a population-based study of 17,315 patients. Leukemia 27:1391-1393
- 50. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM et al (2007) Clinical course and prognosis of smoldering (asyntomatic) multiple myeloma. New Engl J Med 356:2582-2590

- 51. Kyle RA, Rajkumar SV (2009) Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. Leukemia 23:3-9
- 52. Rajkumar SV, Larson D, Kyle RA (2011) Diagnosis of smoldering multiple myeloma. N Engl J Med 365:474-475
- 53. Rajkumar SV, Merlini G, San Miguel JF (2012) Haematological cancer: Redefining myeloma. Nat Rev Clin Oncol 9:494-496
- 54. Dispenzieri A, Stewart AK, Chanan-Khan A et al (2013) Smoldering multiple myeloma requiring treatment: time for a new definition? Blood 122:4172-4181
- 55. Durie BG, Salmon SE (1975) A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival Cancer 36:842-854
- 56. Ghobrial IM, Landgren O (2014) How I treat smoldering myeloma. Blood 124:3380-3388
- 57. Landgren O (2013) Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: biological insights and early treatment strategies. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2013:478-87
- 58. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S et al (2015) Revised international staging system for multiple myeloma. A report from International Myeloma Working Group. J Clin Oncol 33:2863-2869
- 59. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM et al (2009) Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. Blood 113:5412-5417
- 60. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG et al (2005) International staging system for multiple myeloma. J Clin Oncol 23:3412-3420
- 61. Maisnar V, Tichý M, Smolej L et al (2007) Isotype class switching after transplantation in multiple myeloma. Neoplasma 54:225-228
- 62. Alejandre ME, Madalena LB, Pavlovsky MA et al (2010) Oligoclonal bands and immunoglobulin isotype switch during monitoring of patients with multiple myeloma and autologous hematopoietic cell transplantation: a 16-year experience. Clin Chem Lab Med 48:727-731
- 63. Sucak G, Suyanı E, Özkurt ZN et al (2010) Abnormal protein bands in patients with multiple myeloma after haematopoietic stem cell transplantation: does it have a prognostic significance? Hematol Oncol 28:180-184
- 64. Wadhera RK, Kyle RA, Larson DR et al (2011) Incidence, clinical course, and prognosis of secondary monoclonal gammopathy of undetermined significance in patients with multiple myeloma. Blood 118:2985-2987

- 65. Manson GV, Campagnaro E, Balog A et al (2012) Secondary MGUS after autologous hematopoietic progenitor cell transplantation in plasma cell myeloma: a matter of undetermined significance. Bone Marrow Transplant 47:1212-1216
- 66. Schmitz MF, Otten HG, Franssen LE et al (2014) Secondary monoclonal gammopathy of undetermined significance after allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. Haematologica 99:1846-1853
- 67. Katzmann JA, Clark R, Sanders E et al (1998) Prospective study of serum protein capillary zone electrophoresis and immunotyping of monoclonal proteins by immunosubtraction. Am J Clin Pathol 110:503-509
- 68. Bossuyt X (2003) Separation of serum proteins by automated capillary zone electrophoresis. Clin Chem Lab Med 41:762-772
- 69. McCudden CR, Mathews SP, Hainsworth SA et al (2008) Performance comparison of capillary and agarose gel electrophoresis for identification and characterization of monoclonal imunoglobulins. Am J Clin Pathol 129:451-458
- 70. Yang Z, Harrison K, Park YA et al (2007) Performance of the Sebia Capillarys 2 for detection and immunotyping of serum monoclonal paraproteins. Am J Clin Pathol 128:293-299
- 71. Szymanowicz A, Doche C, Schemitick I (2008) A monoclonal immunoglobulin M not visible on the profile of serum capillary electrophoresis. Ann Biol Clin (Paris) 66:465-469
- 72. Zetterberg H, Nilsson-Ehle H (2004) False-negative result in the detection of an IgM monoclonal protein by capillary zone electrophoresis. Clin Chem 50:1878-1880
- 73. Gay-Bellile C, Bengoufa D, Houze P et al (2003) Automated multicapillary electrophoresis for analysis of human serum proteins. Clin Chem 49:1909-1915
- 74. Wils J, Lavoinne A, Vaillant C (2013) Detecting a peak in fraction beta by capillary electrophoresis: interference due to iomeprol. Ann Biol Clin (Paris) 71:196-198
- 75. Lippi G, Daves M, Mattiuzzi C (2014) Interference of medical contrast media on laboratory testing. Biochem Med (Zagreb) 24:80-88
- 76. Seaux L, Van Houcke S, Dumoulin E et al (2014) Dual-wavelength recording, a simple algorithm to eliminate interferences due to UV-absorbing substances in capillary electrophoresis. Electrophoresis 35:2248-2252
- 77. Katzmann JA, Snyder MR, Rajkumar SV et al (2011) Long-term biological variation of serum protein electrophoresis M-spike, urine M-spike, and monoclonal serum free light chain quantification: implications for monitoring monoclonal gammopathies. Clin Chem 7:1687-1692
- 78. Tate J, Caldwell G, Daly J et al (2012) Working Party on Standardized Reporting of Protein Electrophoresis. Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand. Ann Clin Biochem 49(Pt 3):242-256

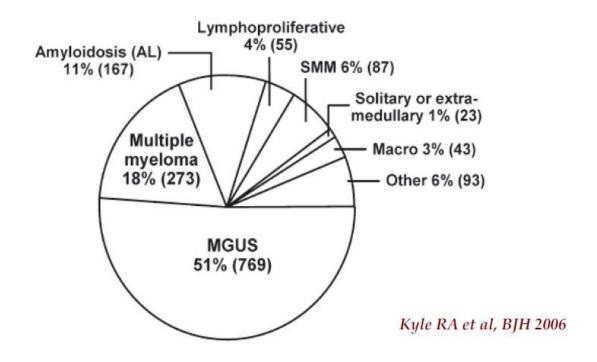
- 79. Boyle EM, Fouquet G, Guidez S et al (2014) IgA kappa/IgA lambda heavy/light chain assessment in the management of patients with IgA myeloma. Cancer 120:3952-3957
- 80. Ruggeri M, Bottan F, Chiarugi P et al (2001) Linee guida per la diagnostica ed il monitoraggio delle gammopatie monoclonali. RivMed Lab-JLM 2:68-71
- 81. Bergón E, Miranda I, Miravalles E (2005) Linearity and detection limit in the measurement of serum M-protein with the capillary zone electrophoresis system Capillarys. Clin Chem Lab Med 43:721-723
- 82. Mussap M, Pietrogrande F, Ponchia S et al (2006) Measurement of serum monoclonal components: comparison between densitometry and capillary zone electrophoresis. Clin Chem Lab Med 44:609-611
- 83. Schild C, Wermuth B, Trapp-Chiappini D et al (2008) Reliability of M protein quantification: comparison of two peak integration methods on Capillarys 2. Clin Chem Lab Med 46:876-877
- 84. Keren DF, Schroeder L (2016) Challenges of measuring monoclonal proteins in serum. Clin Chem Lab Med 54:947-961
- 85. Riches PG, Sheldon J, Smith AM, Hobbs JR (1991) Overestimation of monoclonal immunoglobulin by immunochemical methods. Ann Clin Biochem 1991;28(Pt 3):253-259
- 86. Schild C, Wermuth B, Trapp-Chiappini D et al (2008) Reliability of M protein quantification: comparison of two peak integration methods on Capillarys 2. Clin Chem Lab Med 46:876-877
- 87. Keren DF (2012) Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis. Chapter 3. Chicago: ASCP Press, 41
- 88. Katzman JA, Keren DF (2016) Strategy for detecting and following monoclonal gammopathies. In: Deitrick B, Hamilton R, Folds J, editors. Manual of molecular and clinical immunology. Washington, DC: ASM Press, In Press
- 89. Wunsch C (2015) Extending capillary zone electrophoresis (CZE) of serum proteins. Poster Annual AACC Meeting
- 90. Ludwig H, Miguel JS, Dimoopoulos MA et al (2014) International myeloma working group recommendations for global myeloma care. Leukemia 28:981-992
- 91. Eckold J, Poenisch W, Drogies T et al (2014) Analytical performance and diagnostic potential of immunoassays determining intact immunoglobulin kappa/lambda ratios in monoclonal gammopathies. Clin Lab 60:1491-1500
- 92. Batinić J, Perić Z, Šegulja D et al (2015) Immunoglobulin heavy/light chain analysis enhances the detection of residual disease and monitoring of multiple myeloma patients. Croat Med J 56:263-271
- 93. Katzmann JA, Willrich MA, Kohllhagen MC et al (2015) Monitoring IgA multiple myeloma: immunoglobulin heavy/light chain assays. Clin Chem 61:360-367

- 94. Paolini L, Di Noto G, Maffina F et al (2015) Comparison of Hevylite™ IgA and IgG assay with conventional techniques for the diagnosis and follow-up of plasma cell dyscrasia. Ann Clin Biochem 52(Pt.3):337-345
- 95. Bergon E, Miravalles E (2008) Estimation of serum M-protein concentration from polyclonal immunoglobulins: an alternative to serum protein electrophoresis and standard immunochemical procedures. Clin Chem Lab Med 46:1156-1162
- 96. Murray DL, Ryu E, Snyder MR, Katzmann JA (2009) Quantitation of serum monoclonal proteins: relationship between agarose gel electrophoresis and immunonephelometry. Clin Chem 55:1523-1529
- 97. Barnidge DR, Dasari S, Ramirez-Alvarado M et al (2014) Phenotyping polyclonal kappa and lambda light chain molecular mass distributions in patient serum using mass spectrometry. J Proteome Res 13:5198-5205
- 98. Mills JR, Barnidge DR, Murray DL (2015) Detecting monoclonal immunoglobulins in human serum using mass spectrometry. Methods 81:56-65
- 99. Rajkumar SV, Harousseau JL, Durie B et al (2011) Consensus recommendations for the uniform reporting of clinical trials: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 1. Blood 117:4691-4695
- 100. Bakshi NA, Gulbranson R, Garstka D et al (2005) Serum free light chain (FLC) measurement can aid capillary zone electrophoresis in detecting subtle FLC-producing M proteins. Am J Clin Pathol 124:214-221
- 101. Mussap M, Ponchia S, Zaninotto M et al (2006) Evaluation of a new capillary zone electrophoresis system for the identification and typing of Bence Jones protein. Clin Biochem 39:152-159
- 102. Bossuyt X, Bogaerts A, Schiettekatte G et al (1998) Detection and classification of paraproteins by capillary immunofixation/subtraction. Clin Chem 44:760-764
- 103. Bossuyt X, Schiettekatte G, Bogaerts A et al (1998) Serum protein electrophoresis by CZE 2000 clinical capillary electrophoresis system. Clin Chem 44:749-759
- 104. Smalley DL, Mayer RP, Bugg MF (2000) Capillary zone electrophoresis compared with agarose gel and immunofixation electrophoresis. Am J Clin Pathol 114:487-488
- 105. Cornell FN, McLachlan R (1985) Isolectric focusing in the investigation of gammopathies. In: Biegler B, ed. Advanced Electrophoretic Techniques for Protein Investigation in Clinical Diagnosis. Australian Association of Clinical Biochemists Monograph Series. Sydney: AACB, pp. 31-37
- 106. Beetham R (2000) Detection of Bence-Jones protein in practice. Ann Clin Biochem 37(Pt.5):563-570

- 107. Salomo M, Gimsing P, Nielsen LB (2002) Simple method for quantification of Bence Jones proteins. Clin Chem 48:2202-2207
- 108. Bird J, Behrens J, Westin J et al (2009) 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 147:22-42
- 109. Harrison HH (1991) The 'ladder light chain' or 'pseudo-oligoclonal' pattern in urinary immunofixation electrophoresis (IFE) studies: a distinctive IFE pattern and an explanatory hypothesis relating it to free polyclonal light chains. Clin Chem 37:1559-1564
- 110. MacNamara EM, Aguzzi F, Petrini C et al (1991) Restricted electrophoretic heterogeneity of immunoglobulin light chains in urine: a cause for confusion with Bence Jones protein. Clin Chem 37:1570-1574
- 111. Bailey EM, McDermott TJ, Bloch KJ (1993) The urinary light-chain ladder pattern. A product of improved methodology that may complicate the recognition of Bence Jones proteinuria. Arch Pathol Lab Med 117:707-710
- 112. Levinson SS, Keren DF (1994) Free light chains of immunoglobulins: clinical laboratory analysis. Clin Chem 40:1869-1878
- 113. Attaelmannan M, Levinson SS (2000) Understanding and identifying monoclonal gammopathies. Clin Chem 46:1230-1238
- 114. Cornell FN (2009) Isoelectric focusing, blotting and probing methods for detection and identification of monoclonal proteins. Clin Biochem Rev 30:123-130
- 115. Gertz MA, Comenzo R, Falk RH et al (2005) Definition of organ involvement and treatment response in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL): a consensus opinion from the 10th International Symposium on Amyloid and Amyloidosis, Tours, France, 18-22 April 2004. Am J Hematol 79:319-328

Spettro clinico delle gammopatie monoclonali

1510 pz valutati alla Mayo Clinic nel 2005



(Immagine pubblicata con il permesso degli autori)

Tabella 1. Criteri diagnostici per MGUS, mieloma multiplo asintomatico e mieloma multiplo

MGUS	Mieloma asintomatico	Mieloma sintomatico
CM sierica < 3 g/dl	CM sierica > 3 g/dl	CM sierica o urinaria di
	CM urinaria ≥ 500 mg/l	qualunque entità
Infiltrato plasmacellulare	Infiltrato plasmacellulare	Infiltrato plasmacellulare
midollare ≥ 10%	midollare ≥1 0% e < 60%	midollare o plasmocitoma
No sintomi d'organo (criteri	No sintomi d'organo (criteri	Presenza sintomi d'organo
CRAB)	CRAB)	(CRAB)
		Presenza di marcatori di
		malignità:
		-infiltrato plasmacellulare
		midollare ≥ 60%
		- Rapporto catene leggere
		libere k e $\lambda \ge 100$
		-≥ 1 lesione ossea a esami
		radiologici di II livello

Tabella 2 Fattori di rischio di progressione

		Fattore di rischio (FR)
A	Tipizzazione componente monoclonale	IgA-IgM
В	Dosaggio componente monoclonale	≤ 1,5 g/dl
С	Rapporto catene κ e λ	Alterato

Tabella 3 Criteri di malattia attiva (criteri CRAB)

Segni clinici legati al mieloma	Definizione dei criteri
Ipercalcemia	Calcemia > 0,25 mmol/L (0,5 mg/dl) rispetto ai valori normali o > 2,75
трегеанеенна	mmol/L (> 10,5 mg/dl)
Insufficienza renale	Creatinina > 2 mg/dl
Anemia	Emoglobina < 2 g rispetto ai valori normali o < 10 g/dl
Lesioni ossee	Lesioni litiche, crolli vertebrali, osteoporosi (evidenziati con Rx
	scheletro standard)
Altri criteri	Sindrome da iperviscosità
	Amiloidosi
	Infezioni ricorrenti (> 2 episodi in 12 mesi)

Tabella 4 Test di laboratorio di approfondimento (II livello) nel mieloma multiplo

Esami ematochimici	Finalità
Dosaggio catene leggere libere κ e λ	Indice di massa tumorale
	Valutazione delle frazioni libere delle catene leggere
	(unico test quantitativo utile in corso di mieloma non
	secernente)
Beta 2-microglobulina	Indice di massa tumorale e di funzionalità renale (in
	associazione al valore dell'albumina per la definizione
	dell'ISS)
LDH	Indice di massa tumorale
Cistatina C	Valutazione della funzionalità renale (II livello)
Dosaggio Epo	
NT-proBNP	Valutazione della funzionalità cardiaca
BNP	
Troponina-I	
Analisi cromosomica standard e FISH su	Identificazioni di alterazioni citogenetiche e
plasmacellule midollari selezionate	definizione score prognostico
Immunofenotipo plasmacellule midollari	Definizione della clonalità delle plasmacellule
	neoplastiche, score prognostico, malattia minima
	residua

Tabella 5 Stadiazione del mieloma multiplo secondo Durie&Salmon e *International Staging System* (ISS)

Stadio	Durie & Salmon	ISS	Sopravvivenza mediana
I	Tutti i seguenti: Hb >10 g/dl Calcemia normale o < 12 mg/dl Assenza di lesioni ossee alla Rx standard o plasmocitoma solitario CM IgG < 5g/dl IgA < 3 g/dl BJ < 4 g 24 h	B \square \square 2-microglobulina $\leq 3,5$ mg/L Albumina $\geq 3,5$ g/dl	62 mesi
II	Caratteristiche diverse da stadio I e III	B□□□ 2-microglobulina < 3,5 mg/L e albumina < 3,5 g/dl B□□□ 2-microglobulina 3,5-5,5 mg/L	45 mesi
III	Uno o più dei seguenti: Hb < 8,5 g/dl Calcemia >12 mg/dl		

Multiple lesioni litiche alla Rx	$B \square \square \square$ 2-microglobulina $\geq 5,5$	29 mesi
standard	mg/L	
CM IgG > 7 g/dl		
IgA < 5 g/dl		
BJ > 10 g 24 h		
A: creatinina < 2 mg/dl		
B: creatinina > 2 mg/dl		

Tabella 6 Criteri di valutazione della risposta al trattamento del mieloma multiplo

Categoria di	Criteri di risposta
risposta	_
Risposta completa	CR (come definita sotto) <u>più</u> FLC ratio normale <u>e</u> assenza di
stringente (sCR)	plasmacellule clonali nel midollo ² (in immunoistochimica o
	immunofluorescenza ³)
Risposta completa	Immunofissazione sierica e urinaria negativa e scomparsa di qualunque
(CR)	plasmocitoma dei tessuti molli e < 5% di plasmacellule midollari ²
Risposta parziale	Componente monoclonale sierica e urinaria rilevabile con
molto buona (VGPR)	immunofissazione ma non con elettroforesi o riduzione della componente
	monoclonale sierica ≥ 90% più urinaria < 100 mg/24h
Risposta parziale (PR)	-Riduzione della componente monoclonale sierica ≥ 50% e urinaria ≥ 90% o < 200 mg/24h
	-Se la componente monoclonale sierica e urinaria non sono misurabili, è
	richiesta una riduzione > 50% della differenza tra i livelli di FLC
	coinvolte e non coinvolte.
	-Se la componente monoclonale sierica e urinaria e FLC non sono
	misurabili, è richiesta una riduzione ≥ 50% delle plasmacellule midollari
	(purché l'infiltrazione midollare al <i>baseline</i> fosse > 30%)
	-In aggiunta ai criteri sopra elencati, è richiesta una riduzione > 50% delle dimensione dei plasmocitomi dei tessuti molli se presenti al <i>baseline</i>
Malattia stabile (SD)	Non soddisfatti i criteri per le altre categorie di risposta
Progressione di	Almeno uno dei seguenti criteri:
malattia (PD)	- aumento ≥ 25% del nadir di:
	• componente monoclonale sierica (l'aumento assoluto deve essere > 0,5 g/dl) ⁴
	 componente monoclonale urinaria (l'aumento assoluto deve essere > 200 mg/24h)
	• solo se componente monoclonale sierica e urinaria non
	misurabile, la differenza fra livelli di FLC coinvolte e non
	coinvolte: l'aumento assoluto deve essere 10 mg/dl
	• percentuale di plasmacellule nel midollo: l'aumento assoluto deve essere > 10% ⁵
	- nuove lesioni ossee confermate o plasmocitomi dei tessuti molli o
	aumento confermato della dimensione delle lesioni ossee o dei
	plasmocitomi dei tessuti molli esistenti
	- ipercalcemia (calcio sierico corretto > 11,5 mg/dl o 2,65 mmol/L)
	attribuibile solo a mieloma multiplo

Note:

- 1) Tutte le categorie di risposta richiedono due esami consecutivi eseguiti in qualsiasi momento prima dell'inizio di una nuova terapia; tutte le categorie richiedono inoltre l'assenza di nuove o progressive lesioni ossee (se erano stati eseguiti gli studi radiografici). Gli studi radiografici non sono richiesti per soddisfare i criteri di risposta.
- 2) Non è necessaria la ripetizione della biopsia per conferma.
- 3) La presenza/assenza di cellule clonali è basata sul rapporto κ e λ (è richiesta l'analisi all'immunoistochimica o all'immunofluorescenza di almeno 100 plasmacellule). Un rapporto κ e λ anormale è > 4:1 e < 1:2.
- 4) Per la malattia progressiva, aumenti della componente monoclonale > 1 g/dl sono sufficienti a definire la recidiva se la componente di partenza era > 5 g/dl.
- 5) La recidiva dalla CR ha il *cut-off* al 5% vs 10% delle altre categorie di risposta.