

CAT: Implementatie van de bepaling van vrije lichte ketens in serum in de laboratoriumdiagnostiek van monoclonale gammopathie.

Author	Apr. A. Brouwers
Supervisor	Dr. A. Criel
Search verified by	Dr. M. Langlois
Date	15 - 06 - 2004
Expiry date	15 - 06 - 2006

Clinical bottom line

Huidige conventionele testen voor de bepaling van vrije lichte ketens in urine in het kader diagnose en opvolging van monoclonale gammopathie zijn te weinig gevoelig voor laag geconcentreerde M-proteïnen. De concentratie in de urine is bovendien afhankelijk van verschillende andere factoren buiten de tumormassa en het ziekteverloop. Een recent ontwikkelde assay (Freelite, The Binding Site) combineert de eigenschappen van een zeer lage detectielimiet met een grote analytische specificiteit voor de vrije lichte ketens in serum. Door gebruik te maken van de ratio tussen vrije kappa en lambda ketens kan de test zowel voor het aantonen van monoclonaliteit als opvolging gebruikt worden. Op dit moment zijn er veelbelovende publicaties met betrekking tot AL amyloidosis, LCMM en NSMM. Verder studies zijn echter noodzakelijk, zeker in verband met MGUS en klassieke MM.

Clinical/Diagnostic scenario

Monoclonale gammopathie is een groep van gerelateerde aandoeningen die gekarakteriseerd worden door de clonale expansie van B-lymfocyten of plasmacellen wat de productie (en meestal ook de secretie) van een monoclaal immunoglobuline of M-proteïne tot gevolg heeft. Het kan hierbij gaan om een intacte en/of vrije lichte keten; in zeldzame gevallen kan enkel de vrije zware keten van het immunoglobuline gedetecteerd worden. Uitzonderlijk zijn 2 (biclonale) of zelfs 3 (triclonale gammopathie) klonen betrokken.¹⁰ In bijlage 1 wordt een overzicht gegeven van de verschillende entiteiten onder de noemer “monoclonale gammopathie”.⁷

De klinische presentatie binnen de groep van monoclonale gammopathie kan zeer variabel zijn van klinisch overt en progressief (vb. MM) tot klinisch occult en stabiel (vb. MGUS). Voor behandeling en prognose is het van groot belang zo snel mogelijk een (differentieel-) diagnose te stellen.⁷ De meest frequente symptomen waarmee patiënten zich presenteren zijn opgesomd in bijlage 2.²

Er zijn verschillende criteria voor de (differentieel-)diagnose van monoclonale gammopathie.^{2,35} Hierbij wordt gebruik gemaakt van algemene biochemische en hematologische testen, beenmergbiopsie/botboor (of andere biopsie) en het aantonen en identificeren van het monoclaal immunoglobuline in serum en/of urine.¹⁰ De aanwezigheid, concentratie en het type M-piek heeft ook z'n nut in het kader van staging en follow-up (al dan niet na therapie).⁷

Het opsporen van een monoclaal proteïne gebeurt door screening van alle verdachte patiënten met (high resolution) serum proteïne elektroforese (SPE) of capillaire zone elektroforese (CZE) gevolgd door de identificatie van het paraproteïne (indien aanwezig) via respectievelijk serum immunofixatie (IFE) of immunosubstractie. Kwantificering van de M-piek gebeurt door densitometrie (en omrekening tov totaal eiwit in serum). De kwantificering van totaal IgG, IgA en IgM via nefelometrische/turbidimetrische assays is enkel nuttig om hypogammaglobulinemie van de niet-betrokken immunoglobulines te documenteren.¹¹

De gouden standaard voor het opsporen van vrije lichte ketens in urine of Bence Jones proteïnurie is immunofixatie op een 24u-collectie.^{11,13} Deze complexe en arbeidsintensieve analyse kan in ongeveer de helft van de gevallen overbodig gemaakt worden door een combinatie van urine proteïne elektroforese (UPE) en kwantificering van totale (vrij + gebonden) kappa en lambda lichte ketens (+ κ/λ ratio) in urine. Deze combinatie is echter relatief ongevoelig voor het detecteren van een laag geconcentreerd M-proteïne.³¹ De gebruikte immunoassays hebben bovendien tal van beperkingen (variabele immunoreactiviteit polyclonaal versus monoclonaal, invloed van fragmentatie of polymerisatie, de onmogelijkheid om een onderscheid te maken tussen vrije en gebonden lichte ketens noch tussen polyclonale en monoclonale immunoglobulines....).⁵ De concentratie van vrije lichte ketens in urine is echter afhankelijk van de nierfunctie (o.a. GFR) en zal pas (relatief laat) beginnen op te lopen (en dus gedetecteerd worden) wanneer de (relatief grote) tubulaire reabsorptie (en metabolisatie) capaciteit van de nier voor vrije lichte ketens overschreden wordt.¹⁴ Bovendien kan de concentratie in urine paradoxaal afnemen ten gevolge van ernstige nierinsufficiëntie (gedaalde glomerulaire functie) en dit terwijl de tumormassa eigenlijk toeneemt.¹⁴ Nierfalen is echter een veel voorkomende complicatie bij monoclonale gammopathie en kan dus zorgen voor een moeilijke interpretatie.³ De excretie in urine is bij aandoeningen zoals AL amyloidosis ook afhankelijk van de depositierate in de verschillende weefsels.¹⁴

Het concept om vrije lichte ketens te doseren in serum ipv urine (net als elke andere tumormerker) is niet nieuw maar de ontwikkeling van een assay werd tot nu toe steeds verhinderd door een gebrek aan analytische gevoeligheid (vrije lichte ketens komen in serum immers in veel lagere concentratie voor dan in urine) en specificiteit voor vrije lichte ketens in aanwezigheid van een overmaat aan gebonden lichte ketens (onder de vorm van intacte immunoglobulines) in bloed.¹⁴ Een recent ontwikkelde assay combineert de eigenschappen van een zeer lage detectielimiet met een grote analytische specificiteit voor de vrije lichte ketens in serum. Door gebruik te maken van de ratio tussen vrije kappa en lambda ketens kan de test zowel voor het aantonen van monoclonaliteit als opvolging gebruikt worden. Mogelijk kan deze assay een belangrijke aanwinst betekenen in de diagnose en follow-up van LCMM, NSMM en AL amyloidosis. Hierbij is het betrokken monoclonale immunoglobuline een vrije lichte keten en vaak laag geconcentreerd waardoor met de traditionele testen in veel gevallen geen adequate opsporing en/of accurate dosering mogelijk is. Er zouden ook potentiële voordelen kunnen zijn bij MM en MGUS patiënten.

Questions

1. Wat is de *diagnostische waarde* van de bepaling van vrije lichte ketens in serum (FLC, free light chains) bij monoclonale gammopathie?
2. Heeft de test ook een plaats in de *follow-up (na therapie)* en/of het voorspellen van de *klinische outcome* van patiënten met monoclonale gammopathie?
3. Welke *(pre-)analytische aspecten* spelen een belangrijke rol bij deze assay?
4. *Implementatie* van deze test *binnen de conventionele testen* voor diagnose en opvolging van monoclonale gammopathie.

Search terms

Zoektermen: 'kappa chain immunoglobulin(s)' [MeSH], 'lambda chain immunoglobulin(s)' [MeSH], 'light chain immunoglobulin(s)' [MeSH], 'monoclonal gammo(a)pathy(ies)' [MeSH], 'multiple myeloma(s)' [MeSH], 'myeloma protein(s)' [MeSH], 'amyloidosis' [MeSH], 'Bence Jones protein' [MeSH].

Medline (PubMed)

Sumsearch

National Guideline Clearinghouse

Cochrane library

Professionele organisaties:

British Committee for Standards in Haematology (BCSH):

<http://www.bcshguidelines.com/>.

Relevant Article(s)/References

1. GUIDELINE: Guidelines on the diagnosis and management of AL amyloidosis compiled by a subgroup of the Guidelines Working Group of the UK Myeloma Forum (UKMF) on behalf of the British Committee for Standards in Hematology (BCSH) - a sub-committee of the British Society for Haematology (BSH). Februari 2003 <http://www.bcshguidelines.com>
2. GUIDELINE: Diagnosis and management of multiple myeloma compiled by a subgroup of the Guidelines Working Group of the UK Myeloma Forum (UKMF) on behalf of the British Committee for Standards in Hematology (BCSH) - a sub-committee of the British Society for Haematology (BSH). BJH 2001; 115: 522-540 <http://www.bcshguidelines.com>
3. GUIDELINE: Finnish Medical Society Duodecim. Multiple myeloma (MM). Duodecim Medical publications Ltd.; 2001
4. GUIDELINE: Guidelines for the analysis of Bence-Jones protein by IFCC Committee on plasma proteins and the SIBioC Study Group on proteins. Graziani M, Merlini G, Petrini C. Clin Chem Lab Med 2003; 41: 338-346
5. GUIDELINE: Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, Gorevic PD, Kyle RA, Tomar RH. Arch Pathol Lab Med 1999; 123: 106-107 (+ Introduction to the report of the consensus conference on monoclonal gammopathies. Arch Pathol Lab Med 1999; 123: 104-105)
6. GUIDELINE: Guidelines on the diagnosis and management of solitary plasmacytoma of bone (SBP) and solitary extramedullary plasmacytoma (SEP) compiled by a subgroup of the Guidelines Working Group of the UK Myeloma Forum (UKMF) on behalf of the British Committee for Standards in Hematology (BCSH)- a sub-committee of the British Society for Haematology (BSH). Summer 2003 <http://www.bcshguidelines.com>
7. REVIEW: Alexanian R, Weber D, Liu F. Differential diagnosis of monoclonal gammopathies. Arch Pathol Lab Med 1999; 123: 108-113
8. REVIEW: Kyle RA. Sequence of testing for monoclonal gammopathies. Arch Pathol Lab Med 1999; 123: 114-118
9. REVIEW: Tate JR, Gill D, Cobcroft R, Hickman PE. Practical considerations for the measurement of free light chains in serum. Clin Chem 2003; 49: 1252-1257 (+ Letter to the editor: Clin Chem 2003; 49: 1957-1958)
10. REVIEW: Attaelmannan M, Levinson SS. Understanding and identifying monoclonal gammopathies. Clin Chem 2000; 46: 1230-1238
11. REVIEW: Kyle RA. The monoclonal gammopathies. Clin Chem 1994; 40: 2154-2161
12. REVIEW: Keren DF. Procedures for the evaluation of monoclonal immunoglobulins. Arch Pathol Lab Med 1999; 123: 126-132
13. REVIEW: Beetham R. Detection of Bence-Jones protein in practice. Ann Clin Biochem 2000; 37: 563-570

14. REVIEW: Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Drayson MT. Serum free light chain immunoassays and their clinical application. *Clin Applied Immunol Rev* 2002; 3: 17-33
15. ORIGINAL: Abraham RS, Katzmann JA, Clark RJ, Bradwell AR, Kyle RA, Gertz MA. Quantitative analysis of serum free light chains. A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 274-278
16. ORIGINAL: Lachmann HJ, Gallimore R, Gillmore JD, Carr-Smith HD, Bradwell AR, Pepys MB, Hawkins PN. Outcome in systemic AL amyloidosis in relation to changes in concentration of circulating free immunoglobulin light chains following chemotherapy. *BJH* 2003; 122: 78-84
17. ORIGINAL: Drayson M, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith H, Bradwell AR. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood* 2001; 97: 2900-2902
18. ORIGINAL: Mariën G, Oris E, Bradwell AR, Blanckaert N, Bossuyt X. Detection of monoclonal proteins in sera by capillary zone electrophoresis and free light chain measurements. *Clin Chem* 2002; 48: 1600-1601
19. ORIGINAL: Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Tang LX, Showell PJ, Drayson MT, Drew R. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001; 47: 673-680
20. ORIGINAL: Abraham RS, Clark RJ, Bryant SC, Lymp JF, Larson T, Kyle RA, Katzmann JA. Correlation of serum immunoglobulin free light chain quantification with urinary Bence Jones protein in light chain myeloma. *Clin Chem* 2002; 48: 655-657
21. ORIGINAL: Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP, Harvey TC, Drayson MT. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* 2003; 361: 489-491
22. ORIGINAL: Le Bricon T, Bengoufa D, Benlakehal M, Bousquet B, Erlich D. Urinary free light chain analysis by the Freelite[®] immunoassay: preliminary study in multiple myeloma. *Clin Biochem* 2002; 35: 565-567
23. ORIGINAL: Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, Kyle RA. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free κ and free λ immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem* 2002; 48: 1437-1444
24. ORIGINAL: Nakano T, Nagata A. ELISAs for the free light chains of human immunoglobulins using monoclonal antibodies: comparison of their specificity with available polyclonal antibodies. *J Immunol Method* 2003; 275: 9-17
25. ORIGINAL: Abe M, Goto T, Kosaka M, Wolfenbarger D, Weiss DT, Solomon A. Differences in kappa to lambda ($\kappa:\lambda$) ratios of serum and urinary free light chains. *Clin Exp Immunol* 1998; 111: 457-462
26. ORIGINAL: Solling K, Solling J, Romer FK. Free light chains of immunoglobulins in serum from patients with rheumatoid arthritis, sarcoidosis, chronic infections and pulmonary cancer. *Acta Med Scand* 1981; 209: 473-477
27. ORIGINAL: Axiak SM, Krishnamoorthy L, Guinan J, Raison RL. Quantitation for free κ light chains in serum and urine using a monoclonal antibody based inhibition enzyme-linked immunoassay. *J Immunol Method* 1987; 99: 141-147

28. ORIGINAL: Sinclair D, Dagg JH, Smith JG, Scott DI. The incidence and possible relevance of Bence-Jones protein in the sera of patients with multiple myeloma. *BJH* 1986; 62: 689-694
29. ORIGINAL: Alyanakian MA, Abbas A, Delarue R, Arnulf B, Aucouturier P. Free immunoglobulin light-chain serum levels in the follow-up of patients with monoclonal gammopathies: correlation with 24-hr urinary light chain excretion. *Am J Hematol* 2004; 75: 246-248
30. ORIGINAL: Hofman W, Garbrecht M, Bradwell A, Guder WG. A new concept for detection of Bence Jones proteinuria in patients with monoclonale gammopathy. *Clin Lab* 2004; 50: 181-185
31. ORIGINAL: Levinson SS. An algorithmic approach using κ/λ ratios to improve the diagnostic accuracy of urine protein electrophoresis and to reduce the volume required for immunoelectrophoresis. *Clin Chim Acta* 1997; 262: 121-130
32. ORIGINAL: Cohen G, Rudnicki M, Schmaldienst S, Hörl, WH. Effect of dialysis on serum/plasma levels of free immunoglobulin light chains in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 879-883
33. POSTER: Mead GP, Carr-Smith HD, Drayson MT, Bradwell AR. Detection of Bence Jones myeloma and monitoring of myeloma chemotherapy using immunoassays specific for free immunoglobulin light chains. *Clin Lab* 2003; 49: 25-2733.
34. BOOK: Bradwell AR. Serum free light chain assay. 1th edition 2003
35. BOOK: WHO Classification of tumours. Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. IARC 2001

Critical Appraisal

1. Wat is de diagnostische waarde van de bepaling van vrije lichte ketens in serum bij monoclonale gammopathie?

Het aantal publicaties omtrent het diagnostisch belang van vrije lichte ketens in serum is voorsnog eerder beperkt. In eerste instantie heeft men vooral het nut willen aantonen bij systemische AL amyloidosis, LCMM en NSMM. De komende publicaties zullen zich waarschijnlijk ook meer gaan concentreren op de “klassieke” MM en MGUS patiënt.

A. Systemische AL amyloidosis

In het geval van systemische AL amyloidosis, is de onderliggende plasmaceldyscrasie meestal eerder subtiel en niet-proliferatief. Slechts in 50% van de patiënten kan een M-proteïne gedetecteerd worden door SPE en in 80-89% door IFE op serum of urine.¹ Het gaat hierbij in de meeste gevallen om fragmenten van (zelden intacte) vrije lichte ketens. In 20% van de gevallen is dus zelfs na IFE geen monoclonaal immunoglobuline aantoonbaar. De gouden standaard voor de diagnose is nog steeds een rectale weefselbiopsie (soms naaldbiopt van vetweefsel) of biopsie van het vermoedelijk aangetast orgaan waarin na kleuring amyloid deposits kunnen gevisualiseerd worden. Verder wordt de ernst en de omvang geëvalueerd waarmee de verschillende organen (o.a. hart, nier lever, zenuwstelsel) aangetast zijn.¹ Het documenteren van een plasmaceldyscrasie kan echter een belangrijk supportief element zijn in de diagnose van AL amyloidosis, hoewel de aanwezigheid van een paraproteïne uiteraard niet noodzakelijk betekent dat het om een amyloidosis van het AL type gaat.¹

Abraham et al. (Am J Clin Pathol 2003)¹⁵

- retrospectieve studie, 95 ptn (groep 1)
- vergelijking diagnostische sensitiviteit FLC en IFE
- In de serum IFE-positieve groep (n=37) was de diagnostische sensitiviteit van FLC (of beter de ratio ervan) iets lager dan van IFE (34/37=92%); in de serum IFE-negatieve maar urine IFE-positieve groep (n=40) was de diagnostische sensitiviteit van FLC 100%. In de groep met negatieve serum en urine IFE kon echter in 12/18(=67%) van de gevallen vrije lichte ketens in het serum gedetecteerd worden met FLC. In 4 van deze patiënten kon echter ook via immunohistochemische kleuring geen cytoplasmatische vrije lichte ketens in de plasmacellen aangetoond worden (herrekende sensitiviteit van 12/14=86%).

*Lachmann et al. (BJH 2003)*¹⁶

- retrospectieve studie, 262 ptn
- In 21% van de patiënten kon geen monoclonaal immunoglobuline gedetecteerd worden met serum IFE noch urine IFE. De bepaling van FLC in serum vertoonde een diagnostische sensitiviteit van 98%.

*Guideline BCSH 2003*¹

De bepaling van FLC in serum werd reeds geïmplementeerd in de meest recente richtlijnen met betrekking tot de diagnose van AL amyloidosis op basis van 2 bovenstaande artikels. Er wordt duidelijk op gewezen dat deze test geenszins specifiek is voor systemische AL amyloidosis (o.a. afwijkend in 50% van MGUS en bijna alle MM patiënten; zie verder).

De diagnostische sensitiviteit met betrekking tot AL amyloidosis bedraagt 91% tot 98%. De belangrijkste winst wordt geboekt bij deze gevallen (10-20%) waarbij IFE in serum en urine negatief is maar de bepaling van FLC nog een diagnostische sensitiviteit van 86% haalt.

B. Niet-secretoir multiple myeloma

NSM wordt gekarakteriseerd door de afwezigheid van een detecteerbaar monoclonaal proteïne in serum of urine en vertegenwoordigt 1 tot 5% van alle patiënten met multiple myeloma.¹⁰ In ongeveer 85% van deze patiënten kan de aanwezigheid van cytoplasmatische M-proteïnes wel aangetoond worden via immunohistochemische kleuringen in plasmacellen.¹⁷ Uiteraard zijn SPE en IFE volledig inadequaat en is de diagnose en monitoring gebaseerd op klinische symptomen, hematologische/biochemische testen en beenmergbiopsies/botboren.

*Drayson et al. (Blood 2001)*¹⁷

- retrospectieve studie, 28 ptn
- FLC in serum vertoonde een diagnostische sensitiviteit van (19/28) 68%. 14% vertoonde een borderline kappa/lambda ratio en 18% een normale ratio. Vermoedelijk is dit in overeenstemming met de 15% van de patiënten met NSMM waarbij in plasmacellen geen cytoplasmatische M-proteïnes konden aangetoond worden en dus werkelijke “non-producers” zijn. Dit werd echter in deze studie niet gedocumenteerd door immunohistochemische data van de bestudeerde patiënten.
- 68% van de patiënten kon geherclassificeerd worden tot LCMM (ten gevolge van de hoge analytische sensitiviteit) en dus wel opgevolgd worden aan de hand van de concentratie van het monoclonale immunoglobuline (cfr. infra).

Ongeveer 68% van de patiënten kan (omwille van de hoge analytische sensitiviteit) geherclassificeerd worden van NSMM (vermits IFE in serum en urine steeds negatief is) tot LCMM.

C. Light chain multiple myeloma

Light chain multiple myeloma of Bence Jones myeloma worden gekarakteriseerd door de aanwezigheid van een overmaat aan uitsluitend vrije lichte ketens in urine en/of serum en maken zo'n 15-20% van alle MM patiënten uit.¹³ Vrije lichte ketens in urine kunnen aangetoond en geïdentificeerd worden via IFE maar niet gekwantificeerd.⁵ Voor kleine tumormassa's biedt IFE op urine onvoldoende gevoeligheid. Opvolging gebeurt aan de hand van totale eiwitexcretie in urine per 24u of de bepaling van totale lichte ketens (+ ratio) in urine. Deze bepalingen kennen echter verscheidene analytische en klinische beperkingen (zie Clinical/Diagnostic scenario). Tot 65% van de patiënten met LCMM presenteert zich met een verminderde nierfunctie bij diagnosestelling.²⁰ Bovendien is het ook gekomen van een correcte 24u-collectie ook niet altijd even evident.⁵

*Bradwell et al. (The Lancet 2003)*²¹

- retrospectieve studie, 224 patiënten
- diagnostische sensitiviteit = 100%
- volledig vervangen van 24u-urine door FLC in serum in de diagnose van LCMM

*Abraham et al. (Clin Chem 2002)*²⁰

- retrospectieve studie, 28 patiënten
- diagnostische sensitiviteit = 100%

*Mead et al. (Clin Lab 2003) (voorgesteld als poster)*³³

Het is onduidelijk in hoeverre het hier om dezelfde 224 patiënten van Bradwell et al²¹, dan wel om nieuwe data gaat. Hoewel gebruik werd gemaakt van verschillende referentiewaarden (bijlage 3) werd ook hier een diagnostische sensitiviteit van 100% bekomen.

*Hofmann et al. (Clin Lab 2004)*³⁰

- retrospectieve studie, 34 patiënten
- diagnostische sensitiviteit = 97% versus 85% vrije kappa/ lambda ratio in urine en 88% totale kappa/ lambda ratio in urine

De diagnostische sensitiviteit van FLC voor LCMM bedraagt bijna 100% (wat identiek is aan IFE in urine en/of serum). Dit kan een argument kan zijn om de bepaling op 24u-urine volledig te vervangen door de bepaling van vrije lichte ketens in serum. Vermoedelijk biedt de FLC assay ook de mogelijkheid tot een snellere diagnose aangezien de invloed van de grote tubulaire reabsorptiecapaciteit van de nier op de concentratie in urine omzeild wordt.

D. Multiple myeloma/MGUS

Zie monitoring/follow-up

E. Andere

De aanwezigheid van een monoclonaal immunoglobuline kan in 24-72% van de patiënten met een *solitair plasmacytoom in bot* gedetecteerd worden in serum of urine. Ook hier gaat het dikwijls om zeer lage concentraties.⁶ Bij *extramedullaire solitaire plasmacytoma* kan slechts in < 25% een M-proteïne teruggevonden worden.⁶ Een gevoeliger techniek zoals FLC in

serum kan ook hier potentieel dezelfde voordelen bieden als bij LCMM. Tot nu toe zijn hier rond geen studies gepubliceerd. Voor diagnose en monitoring van **LCDD** zouden logischer wijze dezelfde voordelen kunnen verwacht worden.¹⁴ Ook hier is het wachten op verdere publicaties. Eveneens over de bepaling van FLC in serum in het kader van B-cel leukemie en lymfomen is verder onderzoek aan de gang.¹⁴

2. Heeft de bepaling van vrije lichte ketens in serum een plaats in de monitoring en/of het voorspellen van de klinische outcome van patiënten met monoclonale gammopathie?

A. Systemische AL amyloidosis

Gezien de eerder subtiele plasmaceldyscrasie, wordt het monoclonale immunoglobuline niet of slechts in lage concentraties gedetecteerd door SPE.¹ Bovendien hebben vrije lichte ketens een zeer korte halfwaardetijd in serum. IFE detecteert meer gevallen maar biedt geen mogelijkheid tot kwantitatieve interpretatie. Wanneer patiënten met coëxistente myeloma geëxcludeerd worden, heeft minder dan 10% van de patiënten een M-proteïne in het serum van > 10g/l.¹⁰ Bijgevolg is een accurate dosering in het kader van follow-up van deze lage levels door SPE in de meeste gevallen niet mogelijk. Concentraties in urine kunnen dan weer sterk afhankelijk zijn van de depositie in de verschillende weefsels.¹⁴ De monitoring van patiënten steunt dan ook grotendeels op de respons op therapie van de amyloid deposits (vb. door SAP scintigrafie en inschatten van de orgaangrootte via beeldvormingstechnieken) en de evaluatie van orgaanfuncties (o.a. ECG, totale proteïnurie, levertesten, EMG ledematen, ...).¹ Het gaat dus eigenlijk enkel om een detectie van de reeds opgetreden orgaanschade.

*Abraham et al. (Am J Clin Pathol 2003)*¹⁵

- retrospectieve studie, 34 ptn in follow-up (groep 2)
- vergelijking resultaten IFE en FLC op pre- en post-transplantatie stalen voor de monitoring van de hematologische respons
- Slechts in de helft van de patiënten was follow-up via serum of urine M-piek levels mogelijk. In 21 (62%) patiënten was FLC in serum de enige bruikbare parameter voor follow-up óf vertoonde FLC een snellere respons op therapie.

*Lachmann et al. (BJH 2003)*¹⁶

- retrospectieve studie, 137 ptn in follow-up (pre-treatment versus 6m na chemo)
- Slechts 53% van de patiënten had een monoclonaal immunoglobuline dat accuraat kwantificeerbaar was. Alle patiënten konden opgevolgd worden aan de hand van de FLC in serum.
- duidelijk verband tussen FLC concentraties in serum en klinische outcome: reductie van de abnormale FLC concentratie met meer dan 50% geeft regressie van amyloid (aangetoond door seriële SAP scintigrafie) en een verbeterde overleving (5-jaar survival van 88% versus 39%, P<0.0001) → reductie van FLC met meer dan 50% mogelijk als eindpunt voor therapie

*Guideline BCSH 2003*¹

De bepaling van FLC in serum werd reeds geïmplementeerd in de meest recente richtlijnen met betrekking tot de opvolging van de respons op therapie. De zeer korte halfwaardetijd van FLC in de circulatie maakt een effectieve en snelle follow-up mogelijk vb op maandelijkse basis gedurende behandeling. Evolutie van FLC kan een waarde als prognostische marker hebben.

Alle patiënten konden opgevolgd worden via de bepaling van FLC in serum in tegenstelling tot opvolging via M-piek in serum of urine. In het algemeen was er een goede correlatie met klinische respons en outcome (regressie amyloid en overleving).

B. Niet-secretoir multiple myeloma

Zie diagnose.

*Drayson et al. (Blood 2001)*¹⁷

- retrospectieve studie, 6 ptn in follow-up
- veranderingen in ziekte-activiteit werden gereflecteerd door veranderingen in de FLC concentraties

Aangezien er een herclassificatie naar LCMM mogelijk was, konden deze patiënten ook via FLC in serum opgevolgd worden, wat de nood aan beenmergpuncties kan reduceren.

C. Light-chain multiple myeloma

Zie diagnose.

*Bradwell et al. (The Lancet 2003)*²¹

- retrospectieve studie, 82 patiënten in follow-up
- slechts beperkte correlatie tussen concentratie vrije lichte ketens in serum en urine
- reductie van vrije lichte ketens in serum na chemotherapie in 99% van de patiënten versus 95% in urine
- 11% van de patiënten vertoonde complete remissie op basis van bepaling van vrije lichte ketens in serum versus 32% op basis van vrije lichte ketens in urine (op basis van eerdere studies vermoedelijk rond de 10% remissie)
- volledig vervangen van urine in de follow-up van LCMM

*Abraham et al. (Clin Chem 2002)*²⁰

- retrospectieve studie, follow-up van 2 casussen
- absolute correlatie tussen FLC in serum en BJP in urine is zwak, wel tussen de veranderingen van concentratie
- alternatief voor 24u-urine in follow-up van patiënten

*Alyanakian et al. (Am J Hematol 2004)*²⁹

- 7 casussen met LCMM, AL amyloidosis, MM
- correlatie tussen FLC in serum en vrije lichte ketens in urine (EP en densitometrie) in individuele patiënten, niet tussen patiënten onderling
- correlatie tussen FLC in serum en aantal clinical events in individuele patiënten

De bepaling van vrije lichte ketens in serum geeft potentieel een gevoeliger en accuratere follow-up van het ziekteproces bij LCMM. De invloed van de reabsorptiecapaciteit van de nier kan immers beperkt worden door de bepaling op urine te vervangen door deze op serum.

D. Multiple myeloma en MGUS

Volgens literatuurgegevens zou meer dan 95% van alle “klassieke” MM patiënten een afwijkende ratio en/of concentratie van vrije lichte ketens in serum vertonen zelfs wanneer geen vrije lichte ketens in urine kunnen gedetecteerd worden via conventionele testen.³⁰

Gezien de kortere halfwaardetijd van vrije lichte ketens in serum (2-4uur) in vergelijking met een intact monoclonaal immunoglobuline (2-20d) zou de bepaling van FLC een accuratere follow-up van de patiënt kunnen garanderen, zeker bij laag geconcentreerde M-pieken.¹⁴ FLC zouden ook beter correleren met andere parameters zoals % plasmacellen en β_2 -microglobuline dan de concentratie intact monoclonaal immunoglobuline.³⁴ Tate et al. wijzen toch op een zekere voorzichtigheid bij MM patiënten na autologe stamceltransplantatie. In post-transplant setting werden zowel vals positieve als vals negatieve resultaten gerapporteerd.⁹

Voorlopige studies tonen aan de ongeveer 60% van de **MGUS** patiënten een afwijkende ratio van vrije lichte ketens in serum vertoont wat de parameter minder bruikbaar maakt voor diagnose. Mogelijk is er toekomst als prognostische marker. Bij een follow-up studie over 5 jaar waarbij 50 progressors vergeleken werden met 50 non-progressors, zou in de groep van de progressors significant meer abnormale ratio's van vrije lichte ketens voorkomen dan bij de non-progressors (67% versus 22%).³⁴ Preliminair resultaten van de Mayo Clinic zouden bovendien wijzen op het bestaan van "free light chain monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS)" die enkel via de serum FLC assay zou kunnen geïdentificeerd worden.¹³

*Mead et al. (Clin Lab 2003)*³³

- 4 casussen MM in follow-up
- accuratere follow-up adhv FLC tgv kortere halfwaardetijd in serum versus intact monoclonal immunoglobuline

Het nut van FLC in de diagnose en follow-up van MM en MGUS is nog omstreden. Tot op heden is er nog te weinig evidentie en zijn verder studies noodzakelijk.

Besluit:

Het aantal studies met betrekking tot de bepaling van vrije lichte ketens in de diagnose, prognose en follow-up van monoclonale gammopathie is vooralsnog eerder beperkt. Er zijn veelbelovende resultaten met betrekking tot AL amyloidosis, LCMM en NSMM. Het blijft de vraag of deze volstaan om de test in de dagelijkse laboratoriumroutine voor deze aandoeningen te implementeren (zie vraag 4). De bepaling van vrije lichte ketens in serum werd reeds opgenomen in de meest recente richtlijnen met betrekking tot AL amyloidosis van de BHS.

Het is echter noodzakelijk verder onderzoek op te volgen vermits de bepaling eerst in verschillende lopende studieprotocollen moet geïmplementeerd worden zodat bij meer patiënten gegevens kunnen verkregen worden en dit over een langere follow-up periode. Dit is zeker het geval voor de MM en MGUS patiënt.

3. Welke (pre-)analytische aspecten spelen een belangrijke rol bij deze assay?

A. Pre-analytische factoren

Staaltype: Er blijkt geen significant verschil te zijn tussen bepalingen op serum of plasma (Li-heparine).⁹

Stabiliteit: FLC zijn stabiel gedurende 1 week bij 2°-8° C. Langere bewaring is mogelijk bij -20°C.⁹

Biologische variatie: Weinig gegevens in de literatuur beschikbaar. Op dit moment is de biologische variatie niet significant in vergelijking met de analytische variatie wat meteen de vraag doet rijzen hoe de analytische imprecisie kan verminderd worden (cfr.infra)⁹. FLC ratio is onafhankelijk van leeftijd of geslacht.²³

Fysiologische / Pathologische omstandigheden (andere dan monoclonale gammopathie): Hoewel de concentratie aan FLC kan gestegen zijn (= polyclonale hypergammaglobulinemie) in patiënten met auto-immuunpathologie (zoals SLE), chronisch inflammatoire pathologie (sarcoidose, tuberculose,...) en acuut/chronisch nierfalen, zou de ratio steeds normaal blijven.^{9,14,19,26} Ook bij ouderen kunnen hogere concentraties maar een normale ratio vastgesteld worden, vermoedelijk tengevolge van een verminderde glomerulaire filtratiesnelheid.^{14,23} Dialyse zou slechts een zeer beperkte invloed hebben op de concentratie aan FLC in serum bij patiënten in vergevorderd nierfalen.³² Wanneer echter een associatie met een of andere monoclonale gammopathie voorkomt, wordt wel een abnormale ratio waargenomen en blijft de test dus juist interpreteerbaar.⁹

B. Analytische aspecten

Op dit ogenblik is voor de bepaling van vrije lichte ketens in serum slechts één enkele assay op de markt, zonder internationale standaardisatie: Freelite[®], The Binding Site. De verdeling op de Belgische markt gebeurt door de firma BMD Diagnostics. Deze latex-enhanced turbidimetrische/nefelometrische immunoassay is beschikbaar voor de meest courante immunoanalysers waaronder BNII en BN ProSpec (Dade Behring), Image (Beckman-Coulter), Hitachi 911, 912, 917 en Modular P (Roche) en Olympus AU (Olympus).³⁴

Ondanks het gebruik van dezelfde commerciële bron, leidt dit niet noodzakelijk tot een harmonisatie van resultaten voor verschillende toestellen. Dit is onder meer het gevolg van een variatie in reagentia loten van polyclonaal antiserum en gebruikte methoden (turbidimetrie versus nefelometrie) met verschillende analytische performantie en kan uiteraard invloed hebben bij opvolging van een patiënt over langere periode. De nood aan harmonisatie zal nog toenemen wanneer andere commerciële FLC assays op de markt komen en wiens calibratoren traceerbaar zouden moeten zijn naar de 1° (2° of 3°) standaarden van The Binding Site.⁹

De accuraatheid van de bepaling kan een probleem stellen door onder- of overschatting van de concentratie aan vrije lichte ketens (vb. door een niet-lineaire respons, polymerisatie, fragmentatie,...).⁹ Deze limitaties zijn meestal meer uitgesproken in urine dan in serum maar hebben echter slechts beperkte invloed bij de opvolging van een patiënt binnen eenzelfde labo. Le bricon et al. signaleerden een overschatting van de vrije lichte ketens in urine door Freelite ten opzichte van SPE.²²

Verder zal de imprecisie op de (berekende) ratio (16%)⁹ uiteraard nog groter zijn dan deze op elke afzonderlijk bepaling van vrije lichte kappa of lambda (4-11 CV%) wat tot een moeilijke klinische interpretatie kan leiden.^{9,19}

De analytische sensitiviteit van de Freelite assay is veel groter dan van SPE of IFE in serum. De *detectielimiet* van FLC ligt in de buurt van de fysiologische concentratie in serum (5 mg/l) tegenover 150-500 mg/l voor IFE en 500-2000 mg/l voor SPE. Bovendien kan met SPE nog veel grotere M-pieken over het hoofd gezien worden ten gevolge van diffuse precipitatie (zeker in de beta-zone).¹⁴ De assay range bedraagt ongeveer 3.6-172 mg/l en 5.6-268 mg/l (afhankelijk van het gebruikte toestel) voor respectievelijk vrije kappa en lambda in serum.¹⁹

De assay maakt gebruik van polyclonale antilichamen (schaap) met een voldoende *specificiteit* tegen FLC vermits ze gericht zijn tegen “hidden” epitopen die enkel bij de vrije vormen vrij voor binding met antilichamen beschikbaar zijn. Het is immers noodzakelijk dat de immunoassay zeer specifiek is voor vrije lichte ketens in serum gezien de serum concentraties aan gebonden lichte ketens in intacte immunoglobulines vele malen groter is. De kruisreactiviteit met intacte immunoglobulines of de andere vrije lichte ketens zou minder dan 1:5000 bedragen terwijl andere studies een hogere kruisreactiviteit aangeven.^{14,19} De ontwikkeling van bruikbare monoclonale antilichamen kan deze specificiteit mogelijk nog opdrijven.²⁴ Na toevoegen van triglyceriden (5.95 g/l), hemoglobine (3 g/l), bilirubine (200 mg/l) en reumafactoren werd enkel een beperkte interferentie van deze laatste met de assay vastgesteld.¹⁹

Verschillende studies hebben geprobeerd *referentiewaarden* voor vrije lichte ketens (+ ratio) in serum (en urine) op te stellen (*bijlage 3*). Bij de interpretatie wordt niet de klassieke ratio van ongeveer 2 zoals bij totale kappa/lambda in urine gebruikt. Hoewel in fysiologische omstandigheden twee maal meer kappa dan lambda ketens aangemaakt worden in plasmacellen (2:1), zal serum meer vrije lambda dan kappa ketens bevatten (ratio gemiddeld kleiner dan 1). Doordat kappa als monomeer (25 kDa) en lambda voornamelijk als dimeer (50 kDa) voorkomt, zal kappa immers ongeveer 3 maal sneller geklaard worden en dus toch in lagere concentratie in serum voorkomen.¹⁴

In het overgrote deel van de recentere studies wordt gerefereerd naar de referentiewaarden opgesteld door Katzmán et al.²³ Zij maakten in hun studie niet alleen gebruik van het serum van 127 gezonde donoren tussen 21 en 62 jaar maar ook van 155 donoren tussen 51 en 90 jaar oud. Voor de interpretatie van de kappa/lambda ratio wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van de diagnostische range 0.26-1.65 (= 100% van de referentiepopulatie) en niet van het 95% referentie interval 0.3-1.2, wat een grotere diagnostische specificiteit en positief predictieve waarde oplevert.²³

De Freelite maakt gebruik van een kappa/lambda ratio om plasmacel monoclonaliteit op te sporen. Dit heeft als voordeel dat een eerder semi-kwantitatieve visuele interpretatie vervangen kan worden door een numerische waarde maar dat anderzijds de clonaliteit niet meer letterlijk “visualiseerbaar” is als een discrete band.¹⁴ Bovendien kunnen biclonale gammopathiën een normale ratio geven of kan de ratio nog normaal zijn in het beginstadium van de pathologie.¹⁴

4. Implementatie van deze test binnen de conventionele testen voor diagnose en opvolging van monoclonale gammopathie: het opstellen van een mogelijke flowchart.

Het is op dit moment nog niet duidelijk wat de definitieve plaats van de bepaling van FLC in serum in het labo en in de kliniek kan of zal worden. De belangrijkste pluspunten zijn de hoge analytische sensitiviteit en kwantitatieve aard om zeer lage levels van monoclonale proteïnen

te kunnen opsporen en opvolgen. De mogelijkheid tot zeer frequente dosering zou de nood aan chemotherapie kunnen minimaliseren en herval in vroeg(er) stadium opsporen. Een van de belangrijkste nadelen is een eerder gebrekkige accuraatheid.

Het is zeker niet de bedoeling om FLC assay als een geïsoleerde test te gebruiken. Naar implementatie binnen de conventionele testen voor diagnose en follow-up (bijlage 4) van monoclonale gammopathie zijn er verschillende mogelijkheden:

- 1) FLC samen SPE op niveau van 1^e lijnstest gebruiken (cfr. Mayo Clinics). Dit veronderstelt een specifieke aanvraag voor SPE in het kader van monoclonale gammopathie zodat niet bij elke SPE voor andere indicaties een (relatief dure) FLC assay dient uitgevoerd te worden. Bij een afwijkend resultaat kan vervolgens het paraproteïne geïdentificeerd worden via IFE. Verdere opvolging kan dan enkel via FLC gebeuren.
- 2) Gebruikelijke flowdiagram blijft behouden; alleen zal in het kader van follow-up en diagnose de bepaling van totale kappa/lambda in urine vervangen worden door een bepaling van vrije kappa/lambda in serum, dit omwille van de reeds eerder vernoemde voordelen van serum ten opzichte van urine.
- 3) Het gebruik van FLC assay beperken tot zeer specifieke indicaties zoals moeilijk te stellen diagnose of follow-up van AL, NSMM, LCMM of andere.

To do

1) Gezien de relatief hoge prijs per test (15,40 euro exclusief calibratoren en controlemateriaal), het feit dat de test vooralsnog niet terugbetaald wordt door het RIZIV en de nog relatief beperkte data, werd gekozen om de FLC assay enkel voor zeer specifieke indicaties uit te voeren.

2) Gezien de beperktheid hiervan, dient het aanbeveling de stalen door te sturen naar enkele grote centra die toch een redelijke TAT kunnen garanderen wat follow-up mogelijk kan maken.

3) Verder publicaties opvolgen naar evidentie voor een meer veralgemeend gebruik van de test in de diagnose en follow-up van monoclonale gammopathie.

Addendum

Bijlage 1: Overzicht van de verschillende entiteiten onder de noemer “monoclonale gammopathie”

Myeloma
Solitary plasmacytoma
Bone
Extramedullary
Asymptomatic myeloma
Multiple myeloma
POEMS syndrome
Waldenström's macroglobulinemia
Overt disease
Asymptomatic disease
Heavy-chain diseases
Protein infiltrative or deposition diseases
Amyloidosis (AL)
Immunoglobulin deposition disease
Monoclonal gammopathy of undetermined significance
Chronic
Transient (after myeloablative therapy)

Uit: Alexanian R, Weber D, Liu F. Differential diagnosis of monoclonal gammopathies. Arch Pathol Lab Med 1999;123:108-113

Bijlage 2: Belangrijkste klinische symptomen van monoclonale gammopathie

- overklaarbare vermoeidheid
- anemie, recurrenente or persisterende bacteriële infecties en trombopenie (tgv beenmergonderdrukking)
- botpijn, osteolytische leasies, fractures
- hypercalcemie
- nierfalen
- verhoogde sedimentatiesnelheid en/of viscositeit
- perifere neuropathie, carpal tunnel syndroom, cardiomyopathie
- cryoglobulinemie
-

Uit: GUIDELINE: Diagnosis and management of multiple myeloma compiled by a subgroup of the Guidelines Working Group of the UK Myeloma Forum (UKMF) on behalf of the British Committee for Standards in Hematology (BCSH) - a sub-committee of the British Society for Haematology (BSH). BJH 2001; 115: 522-540 <http://www.bcshguidelines.com>

Bijlage 3: Overzicht van de gebruikte toestel en referentiewaarden in de geciteerde artikels

Publicatie	Toestel	Kappa	Lambda	Ratio
Drayson 2001	BNII	8.4*	14.5*	0.6 (0.36-1.0)**
Bradwell 2001	Immagine	8.4*	14.5*	0.6 (0.36-1.0)**
Abraham 2002	BNII	2-11.2**	6.8-25.2**	0.09-0.89**
Katzmann 2002	BNII	3.3-19.4***	5.7-26.3***	0.26-1.65**
Abraham 2003	BNII	3.3-19.4***	5.7-26.3***	0.3-1.2***
Bradwell 2003	?	3.3-19.4***	5.7-26.5***	0.26-1.65**
Lachmann 2003	BNII	3.3-19.4***	5.7-26.3***	0.59 (0.3-1.2)***
Mead 2003	BNII	13.7 (7.0-22.6)	18.6 (9.9-34.4)	0.77 (0.30-1.57)
Hofmann 2004	BN Pro	3.3-19.4***	5.7-26.3***	0.26-1.65**

Kappa, lambda en ratio uitgedrukt als *gemiddelde, *(gemiddelde met) range, *** (gemiddelde met) 95% referentie interval.

Bijlage 4: Flow schema voor het opsporen van een paraproteïne in AZ St.-Jan te Brugge

