

CAT: Bepaling van vrije lichte ketens in serum met Freelite^{FM}

Danielle Van der beek

2^e jaar GSO Klinische biologie

2003-2004

Supervisor: Dr. A. Mewis

Dr. J.L. Rummens

Virga Jesseziekenhuis Hasselt

1. Clinical bottom line

De bepaling van vrije lichte ketens in het serum kan een hulp zijn bij de diagnosestelling en opvolging van amyloidosis, niet-secretoir myeloma en smoldering myeloma. Verder is het nuttig bij de diagnose en de follow-up van light chain disease.

2. Clinical/Diagnostic scenario

De monoklonale gammopathieën is een groep van ziekten geassocieerd met monoclonale proliferatie van plasmacellen. Een multiple myeloma of de ziekte van Kahler is een kwaadaardige monoklonale gammopathie. De voornaamste gevolgen zijn osteolytische botletsels en secundair hieraan hypercalcemie, renaal lijden, anemie. De symptomatologie is vaak zeer aspecifiek: botpijnen, vaak alleen vage ruglast, moeheid en zwakte, frequente infecties, beeld van overvulling, hyperviscositeit of eventueel tekenen van hypercalcemie.

De jaarlijkse incidentie bedraagt 4 op 100 000, maar deze neemt toe de laatste jaren. Het is een ziekte die voornamelijk bij oudere personen voorkomt: slechts 18% van de patiënten is jonger dan 50 jaar.

In 2003 werd de **classificatie van multiple myeloma**, bekend als de Durie Salmon stadiëring, (MGUS, smoldering myeloma en vervolgens stadium I tot III met onderverdeling A en B naargelang de aanwezigheid van ernstig renaal lijden of niet) herzien door de International Myeloma working group.[1] De termen MGUS en smoldering myeloma worden behouden. Het voorkomen van een 'myeloma definiërende dysfunctie' bepaalt de definitie van multiple myeloma en op dat moment dient een behandeling ingesteld te worden. Het acroniem CRAB dient als geheugensteun: verhoogd Calcium in het serum, Renale insufficiëntie, Anemie en Botaantasting.

Meteen werd een **internationale prognostische score** gekoppeld aan deze definitie waardoor betere subgroepen kunnen afgeleid worden en de

behandeling hieraan kan aangepast worden. Drie stadia worden gedefinieerd door het $\beta 2$ microglobuline gehalte en het albumine gehalte in serum. Zie tabel I

Stadium I	$\beta 2$ microglobuline < 3,5 mg/dl	Albumine < 3,5 g/dl
Stadium II	$\beta 2$ microglobuline < 3,5 mg/dl of $\beta 2$ microglobuline 3,5 -5,5 mg/dl	Albumine > 3,5 g/dl
Stadium III	$\beta 2$ microglobuline > 5,5 mg/dl	

Tabel I: International Myeloma Working Group staging system
Proposed IPI staging system [2]

De belangrijkste prognostische factor is echter de aanwezigheid van bepaalde karyotype afwijkingen in het chromosomaal materiaal van de myeloom patiënt met name de aanwezigheid van een deletie in het chromosoom 13. [3],[4]

De meeste van de aanbevolen testen voor de **diagnose** van multiple myeloma en gerelateerde aandoening worden algemeen aanvaard. [5], [6] Zie Tabel II

Anamnese en klinisch onderzoek

Volledige bloedformule en perifere bloeditstrijkje

Chemie parameters inclusief calcium, creatinine, totaal eiwit en albumine

$\beta 2$ -microglobuline, CRP, LDH

Serum eiwitelectroforese, immunofixatie

Nefelometrische kwantificering van de immunoglobulines IgA, IgM, IgG

Routine urine-analyse, 24u urine collectie voor elektroforese en immunofixatie

Kwantificatie van M-component in de urine en albuminurie

Beenmergpunctie en botboor (cytogenetica, immunofenotypering en plasma cel labeling index, indien beschikbaar)

Botstatus inclusief wervelkolom, bekken, humeri en femur.

Meten van vrije monoclonale lichte ketens is een optie indien de M-component kwantificatie negatief of twijfelachtig is [5]

Tabel II: vereiste testen bij vermoeden van myeloma

1 M-proteïne component meten

Voor het opsporen van monoclonale proteïnen wordt serum elektroforese en/of urine elektroforese aanbevolen. Nefelometrische bepalingen van M-proteïne zijn aanvaardbaar en worden vooral aangeraden bij multimeren of geaggregeerde M-proteïnen, wat nogal eens gezien wordt bij IgA. Bij lage levels van het serum M-proteïne is nefelometrie essentieel.

De groep van Durie et al. bevelen aan om indien er geen M-component gedetecteerd wordt, de 'Freelite^{FM}' test te gebruiken om de vrije kappa/lambda ratio te bepalen. Deze nieuwe techniek kan een hulp zijn bij niet-secretair myeloma en/of minimale residuele ziekte. De serum 'Freelite^{FM}' test is ook positief in de meerderheid van de patiënten met detecteerbare monoclonale M-proteïnen in de urine. Hoewel serum Freelite^{FM} gebruikt kan worden voor monitoring van ziekte, is eiwitmeting in urine voor light-chain disease nog steeds aanbevolen. Een 24 uur urinecollectie is nog altijd onmisbaar, bijvoorbeeld om eiwit in urine te kwantificeren. De hoeveelheid Bence-Jones lichte ketens en albumine in urine zijn belangrijk. [5]

Leden van de 'Guidelines Working Group of the UK Myeloma Forum' (BCSH) hebben guidelines opgesteld omtrent de diagnose van amyloidosis.

Zij suggereren om vrije lichte ketens te bepalen in het serum bij vermoeden van amyloidosis. Ze duiden wel op het feit dat deze test niet specifiek is voor amyloidosis. Vrije lichte ketens kunnen ook aanwezig zijn bij patiënten met MGUS en/of multiple myeloma. [7]

2 beeldvorming

Standaard radiologie van het skelet is de 'gouden standaard' voor de basisevaluatie van multiple myeloma.

Nieuwe technologieën zoals CT, MRI en whole-body FDG/PET zijn niet verplicht, maar kunnen leiden tot nieuwe staging. [5]

MRI van het axiale skelet is informatief indien beschikbaar, maar niet verplicht. Whole-body FDG/PET imaging is niet verplicht, maar kan gebruik worden om MGUS en/of extramedullair myeloma, infectie, en/of geassocieerde tweede maligniteit te confirmeren of uit te sluiten.

3 cytogenetica en moleculaire analyse

Er zijn correlaties tussen chromosomale afwijkingen en prognose. Er bestaat geen twijfel over het feit dat chromosoom 13 deletie een slechte prognostische factor is. [3], [4] Er is echter geen unanimititeit over het feit of cytogenetisch onderzoek behoort tot de basis onderzoeken. De reden hiervan is dat

cytogenetisch onderzoek van het beenmerg niet overal beschikbaar is. Bovendien is de selectieve behandeling van patiënten met chromosoom 13 deleties en/of andere afwijkingen niet echt afgelijnd. [5]

3. huidige laboratoriumtechnieken voor opsporen van paraproteïnen

1 electroforese

De voornaamste indicatie voor het uitvoeren van een serum eiwitelectroforese is het opsporen van monoclonale proteïnen. Dit is een scheidingstechniek waarbij eiwitten migreren onder een elektrische veld met een verschillende snelheid, afhankelijk van hun electronegativiteit. Dit gebeurt op een drager (agarose of cellulose acetaat) of in een silica capillair (capillaire zone electroforese). Naast deze electroforetische kracht, wordt de scheiding bij alkalische pH tevens beïnvloed door de stroom van positief geladen bufferionen naar de kathode (electro-endosmose). De relatieve hoeveelheid van de verschillende fracties wordt bepaald door directe absorptiemeting van de eiwitband bij capillaire zone electroforese of door densitometrie na fixatie en kleuring van de eiwitten bij agarose-en cellulose acetaat electroforese. Monoklonale immunoglobulinen verschijnen meestal in de γ -fractie, maar ze kunnen ook in de β - of α_2 -fractie voorkomen. Wanneer een monoclonale band aanwezig is, wordt er een immunofixatie uitgevoerd om na te gaan om welk type zware- en lichte ketens het gaat.

Electroforese kan uitgevoerd worden zowel op het serum als op geconcentreerde urine.

Deze semi-kwantitatieve techniek is goedkoop. Door de visuele beoordeling vrij subjectief. Het is een relatief ongevoelige test waarbij gelet moet worden op pitfalls zoals bijvoorbeeld monoclonalen in de β -fractie die nogal eens gemist worden. Indien enkel een electroforese op serum gedaan wordt, zal een LCMM over het hoofd gezien worden.

2. immunofixatie

a) agarosegel

SERUM

Immunofixatie wordt gebruikt voor typering van de monoclonale piek op electroforese. De eerste stap is een gewone electroforese op agarose-gel, in tweede instantie worden de gamma-, alfa-, mu-, kappa- en lambda ketens van de immunoglobulines gefixeerd met hun respectievelijke monospecifieke antisera. Na incubatie worden ongebonden of oplosbare proteïnen weggewassen. Tenslotte worden de precipitaten of immuuncomplexen gekleurd.

URINE

Voor het opsporen van Bence-Jones eiwitten in geconcentreerde urine worden de totale kappa-en lambda ketens en vrije kappa-en lambda-ketens van de immunoglobulines gefixeerd met hun respectievelijke monospecifiek antiserum. De gamma-, alfa-, en mu ketens worden gefixeerd met een trivalent serum.

Deze kwalitatieve techniek is gevoeliger dan de elektroforese, vrij arbeidsintensief. Ook hier is de visuele interpretatie niet altijd even gemakkelijk. Niet-secretoire myeloma's zullen gemist worden met deze techniek zowel op serum als op 24-uurs urine.

b) capillaire elektroforese

Bij capillaire elektroforese wordt er gebruik gemaakt van de immuunsubstractietechniek.

3 dosage van totaal (vrije en gebonden) lichte ketens

Voor de kwantitatieve bepaling van totale (vrije en gebonden) lichte ketens en volledige immunoglobulines gebruikt men een nefelometrische bepaling (Beckman IMMAGE). Dit toestel is gebaseerd op nefelometrie. Bij nefelometrie wordt de lichtverstrooiing gemeten, veroorzaakt door vorming van immuuncomplexen.

Voor de lichte ketens gebruikt men ook kappa/lambda ratio's. De normale verhouding bedraagt 1,47-2,95. Bij verstoring van de verhouding kunnen we aannemen dat er een verhoging is van een bepaald monoclonaal paraproteïne. Is er een verhoging van de totale concentratie van kappa en lambda en een normale ratio dan kunnen we aannemen dat er een polyclonale stijging heeft plaatsgevonden.

Deze kwantitatieve, geautomatiseerde techniek is niet onderhevig aan subjectieve beoordeling zoals bij eerder besproken technieken. Bovendien is de test snel en vrij goedkoop. Een belangrijk nadeel is echter dat zowel vrije als gebonden lichte ketens bepaald worden. Daardoor is de methode minder gevoelig en worden soms significante paraproteïnen gemist.

4. Questions

1. Is de bepaling van vrije lichte ketens in het serum een goede test bij de diagnose van multiple myeloma en aanverwante ziekten?
2. Kan de bepaling van vrije lichte ketens in het serum gebruikt worden om de prognose van een patiënt te bepalen?
3. Is het nuttig de bepaling van vrije lichte ketens in het serum op te volgen?
4. Welke laboratoriumtest uitvoeren voor de bepaling van vrije lichte ketens in serum?

5. Search terms

Zoektermen: "multiple myeloma"[MeSH], "diagnosis"[MeSH], free light chain
Databases: Medline, National Guideline Clearinghouse, Sumsearch, google

6. Relevant Articles/References

1. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the international myeloma working group. *Br J Haematol* (2003) 121(5):749-57
2. Griep PR et al. Development of an international prognostic index (IPI) for myeloma: report of the international myeloma working group *Haematol J* (2003) 4 (suppl1): P7.1 S42-S45
3. Tricot G et al. Predicting long-term (> 5 years) event-free survival in multiple myeloma patients following planned tandem autotransplants. *Br J Haematol* (2002) 116:211-217
4. Facon et al. Intergroupe francophone du myelome chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum $\beta 2$ microglobuline produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* (2001) 97:1566-1571
5. Durie et al. Myeloma management guidelines: a consensus report from the scientific advisors of the international myeloma foundation. *The haematology Journal* (2003) 4, 379-398
6. www.guideline.gov
7. Guidelines on the Diagnosis and Management of AL Amyloidosis. Citation: *British Journal of Haematology* (2004) 125(6) 681-700
8. Edgardo J C et al. Multiple myeloma: Clinical Review and Diagnostic Imaging Radiology (2004) 231:11-23
9. Mariën et al. Detection of Monoclonal Proteins in sera by Capillary Zone Electrophoresis and Free light chain measurements. *Clin Chem* (2002) 48: 1600-1601
10. A.R. Bradwell et al. Serum immunoglobulin free light chain measurements in intact immunoglobulin Multiple myeloma. *Blood* (2002) 100:11
11. Bradwell et al. Serum test for assessment of patients with Bence Jones myeloma. *Lancet* (2003) 361:489-491
12. Drayson MT et al. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood* (2001)97:9;2900-2902
13. McLaughlin P et al. Myeloma Protein Kinetics Following Chemotherapy. *Blood* (1982)60: 851-855
14. Dimopoulos Ma et al Risk of Disease Progression in Asymptomatic Multiple Myeloma. *Amer J Med* (1993)94: 57-61

15. Cesana et al. Prognostic factors for Malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering myeloma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1625-1634
16. Lachmann HJ et al. Detection of monoclonal free light chain by nephelometry in systemic AL amyloidosis. *Clin Chem* 2002;48:A164:pE45
17. Abraham et al. Detection of serum immunoglobulin light chain by mass spectrometry in light chain-associated amyloidosis. *Blood* 2001;98: 11: No 3722
18. Abraham et al. (Mayo Clinic). Quantitative analysis of serum free light chains. A new marker for the diagnostic evaluation of primary systemic amyloidosis. *Am J Clin Pathol* 2003;119:2:274-8
19. Katzmann JA et al. Serum Reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem* 2002;48: 1437-1444
20. Kyle RA et al. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. In *haematology/Oncology Clinics of North America: Monoclonal gammopathies and related disorders*. Eds. RA Kyle and M A Gertz; Pub: W B Saunders Co. Philadelphia; 1999; 13:6:1181-1202
21. Baldini L et al. Role of different hematologic variables in defining the risk of malignant transformation in monoclonal gammopathy. *Blood* 1996;87:912-918
22. Cesana et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2002 Mar 15;20(6):1625-34.
23. Kyle RA et al. Clinical application of free light chain assays', November 2002, at Warwick University, UK
24. Mariastella Graziani et al. Guidelines for the Analysis of Bence Jones Protein *Clin Chem Lab Med* (2003) 41(3):338-346

7. Critical Appraisal

1. Is het nuttig om vrije lichte ketens te bepalen volgens de literatuur?

1 multiple myeloma

33 serumstalen van patiënten met een intact immunoglobuline vertonen slechts in 40% van de gevallen een gestoorde vrije lichte keten kappa/lambda ratio. Deze stalen hadden geen monoclonale piek met capillaire zone electroforese, maar vertoonden wel een M-proteïne op immunofixatie. Mariën et al besluiten dat vrije lichte keten bepaling geen gevoeliger methode is dan immunofixatie voor de bepaling van intacte immunoglobulines. Ze suggereren dat verdere studie moeten uitwijzen of het vinden van een gestoorde vrije lichte keten kappa/lambda ratio een prognostische waarde heeft. [9]

Een studie van Bradwell toont dat gemiddeld 96% van een groep van patiënten met een intact multiple myeloma (n=534) een gestoorde vrije lichte keten kappa/lambda ratio heeft. [10]

De halfwaarde tijd van intacte immunoglobulines is dagen (2-25d) en de halfwaardetijd van lichte ketens slechts enkele uren. Daarom is het nuttig de lichte ketens op te volgen tijdens therapie bij patiënten die naast een verhoogd intact immunoglobuline ook een excès aan monoclonale lichte ketens hebben.

Vaak wordt er gebruik gemaakt van $\beta 2$ -microglobuline bij follow-up. Wanneer tijdens monitoring van de ziekte zowel $\beta 2$ -microglobuline als vrije lichte ketens bepaald worden, zijn er meer uitgesproken verschillen bij de vrije lichte keten bepaling, zodat herstel sneller opgemerkt wordt. Toch behoudt $\beta 2$ -microglobuline een belangrijke rol in de prognose. [10],[11]

Besluit: Bij patiënten met intact immunoglobuline multiple myeloma kunnen de serum vrije lichte keten concentraties gestoord zijn. De bepaling van vrije lichte ketens kan belangrijk zijn bij het opvolgen van de ziekte tijdens therapie. Voor de internationale prognostische score blijft de bepaling van $\beta 2$ -microglobuline noodzakelijk.

2 light chain multiple myeloma

Alle 21 patiënten met light chain disease hadden een gestoorde vrije kappa/lambda ratio. Van 16 serumstalen werd ook de totale lichte keten concentratie bepaald. Deze ratio was slechts gestoord in 5 gevallen. [9]

Slecht in de helft van de gevallen zal serum electroforese een monoclonale band tonen bij deze patiënten. Vaak vindt men hypogammaglobulinemie. Serum immunofixatie zal bij de meest patiënten een band vertonen, maar een 24-uurs

urine staal voor immunofixatie is vereist om de vrije lichte ketens te identificeren.

Aangezien vrije lichte ketens immunoassays gevoeliger zijn dan andere testen voor opsporen van vrije lichte ketens, suggereert men dat urine testen zouden kunnen afgeschaft worden. De groep van Bradwell onderzocht 224 patiënten met LCMM. Op het tijdstip van de diagnose vertoonden ze allemaal een gestoorde serum vrije lichte ketens ratio. De ratio's waren duidelijk verschillend van die van normale personen (n=282) en patiënten met nierfunctiestoornissen (n=31). Deze laatste groep had zowel gestegen kappa als lambda lichte ketens, met een normale ratio tot gevolg.

Twee patiënten met LCD werden gevolgd tijdens en na chemotherapie. Vrije lichte ketens in de urine werden vrij snel ondetecteerbaar. De vrije lichte ketens in het serum bleven meetbaar en gaven een accurate reflectie van therapie. Serum vrije lichte ketens zijn een betere indicator voor 'minimal residuele disease' dan urine vrije lichte ketens. [12]

Besluit: Serum vrije lichte ketens zijn belangrijk voor diagnose en follow-up van light chain multiple myeloma disease!

3 niet-secretoir multiple myeloma

Niet-secretoir multiple myeloma is een zeldzaam myeloma met vaak afwezigheid van monoclonale immunoglobulines in serum en urine m.b.v. elektroforese. In het VK bestudeerde het Medical Research Council 28 niet-secretoire multiple myeloma's. 23 hiervan hadden een abnormale vrije lichte keten ratio. De overige 5 hadden een normale ratio. Slecht 6 patiënten vertoonden een zwakke en diffuse band bij serum immunofixatie. Gesuggereerd wordt dat polymerisatie uitsmeren van de monoclonale banden veroorzaakt op de gels.

Follow-up van 6 patiënten met niet-secretoir myeloma toont hoge levels bij presentatie, lage levels t.h.v. de plateau-fase en opnieuw hoge levels bij relaps. [13]

Besluit: bij patiënten met niet-secretoir multiple myeloma kan bepaling van vrije lichte ketens nuttig zijn voor de diagnose en follow-up.

4 smoldering myeloma

Zolang er geen significante symptomen zijn, hoeft de patiënt met een smoldering myeloma niet behandeld te worden. Aanwezigheid van vrije lichte ketens in de urine van deze patiënten blijkt een slechte prognostische factor te zijn. In een studie van 25 patiënten met smoldering myeloma hadden 64% een gestegen

serum kappa of lambda lichte ketens en 96% een abnormale ratio. De relevantie naar outcome is ongekend. [14],[15]

Besluit: bij patiënten met een smoldering myeloma kan bepaling van vrije lichte ketens bijdragen tot de diagnose.

5 amyloidosis

Primaire systemische amyloidosis is een eiwit conformatie stoornis gekarakteriseerd door depositie van monoclonale lichte keten fragmenten als amyloid deposities. De patiënten presenteren zich met hart- of nierfalen, maar huid, perifere zenuwen en andere organen kunnen ook aangetast zijn. Zonder chemotherapie is er zeldzaam overleving na 12 maanden.

In het National Amyloidosis Centre in Londen had men op 262 serumstalen van patiënten met amyloidosis vrije lichte ketens bepaald. 98% van de stalen hadden een abnormale vrije lichte keten concentraties. Slechts 3% van de patiënten hadden voldoende monoclonale vrije lichte ketens om gedetecteerd te worden met electroforese. In de amyloidosis patiënten waren de concentraties van de vrije lichte ketens lager dan die geobserveerd in patiënten met light chain multiple myeloma. [16]

In de Mayo Clinic werden 95 patiënten met amyloidosis geselecteerd gebaseerd op het feit dat ofwel in het serum ofwel in de urine een paraproteïne aanwezig was op immunofixatie. De stalen die een paraproteïne vertoonden op immunofixatie gaven slechtere resultaten met freelite^{FM}. Urine-en serum stalen zonder paraproteïne op immunofixatie gaven een hogere gevoeligheid met freelite^{FM}. Blijkbaar zijn vrije lichte keten metingen vooral belangrijk bij patiënten met een negatieve immunofixatie! [17]

Patiënten met amyloidosis kregen een stamcel transplantatie (n=34). Al de patiënten konden opgevolgd worden met de bepaling van vrije lichte ketens. [18]

In 127 patiënten met amyloidosis werd er een vergelijking gemaakt tussen SAP scans en de bepaling van vrije lichte ketens in serum voor en 12 maanden na chemotherapie. Er was een goede correlatie tussen de veranderingen van de SAP scans en de verandering van de vrije lichte ketens in het serum. Toch was er met de vrije lichte keten bepaling soms overlapping tussen de verschillende groepen (stabiele groep, regressie en progressie). [16]

Besluit: Bij patiënten met amyloidosis is de bepaling van vrije lichte ketens in het serum vooral belangrijk bij patiënten met een negatieve immunofixatie.

6 light chain deposition disease

Dit is een vergelijkbare ziekte zoals hoger beschreven. Zoals amyloidosis is het een progressieve ziekte met nier- hart- en leverfalen met een slechte prognose. De ziekte komt vaak voor bij jonge vrouwen (30-50j).

In een recente studie werden 17 van de 19 patiënten gedetecteerd met vrije lichte ketens. [19]

7 monoclonale gammopathy of undetermined significance (MGUS)

Deze term duidt op de aanwezigheid van een monoclonaal intact immunoglobuline in patiënten zonder evidentie voor een multiple myeloma.

6 van de 8 patiënten met MGUS hadden een gestoorde vrije lichte keten kappa/lambda ratio. Bij 3 van de 8 stalen waren zowel de kappa vrije lichte ketens als de lambda vrije lichte ketens gestegen. [9]

MGUS wordt vaak aangetroffen in de populatie boven de 50 jaar (1%). MGUS kan transformeren naar een echte maligne monoclonale gammopathie. Daarom is de follow-up van deze patiënten belangrijk. In een studie in de Mayo Clinic werden 1384 patiënten met MGUS opgevolgd. Er was geen verhoogd risico op progressie bij patiënten met urine vrije lichte ketens of bepaalde immunoglobuline subklasse. Patiënten met IgM of IgA hadden een hoger risico op progressie dan patiënten met IgG. [20]

Baldini et al deed een studie waaruit blijkt dat vrije lichte ketens in urine een prognostische factor zijn voor progressie van ziekte.

Een Italiaanse studie van 1231 patiënten vond geen correlatie tussen Bence Jones proteïnurie en maligne transformatie. [22]

In de Mayo Clinic werden 50 patiënten met MGUS gevolgd over 5 jaar. In de patiënten groep die progressie vertoonde, waren de kappa of lambda serum levels gestegen met 30% en de ratio was abnormaal in 67% van de gevallen. In patiënten zonder progressie waren de kappa en lambda levels gestegen in 22% en waren de ratio's abnormaal in 22%. [23]

Besluit: de prognostische waarde van serum vrije lichte ketens is weinig overtuigend bij MGUS patiënten.

8 andere

1. Multiple sclerosis

De oligoclonale banden in multiple sclerosis worden best gedetecteerd met iso-electric focussing. (CSF) De banden bevatten meestal intacte oligoclonaal IgG met kappa of lambda. Er kan een verhoogd serum vrije lichte ketens gevonden

worden. Typisch is dat lambda hoger is dan kappa aangezien het een dimeer is. Er zijn nog geen studies over het bepalen van vrije lichte ketens in cerebro-spinaal vocht. Voorlopig blijft iso-electric focussing de gouden standaard.

2. Polyclonale stijging van serum vrije lichte ketens

Ziekten geassocieerd met een gegeneraliseerde stijging in B-cel activatie kunnen een hoge concentratie van polyclonale immunoglobulines en polyclonale vrije lichte ketens hebben. Oorzaken zijn de volgende: chronische infecties, auto-immune- en bindweefselziekten, geneesmiddelen, enz... Vaak ligt de ratio van vrije lichte ketens in de normale range.

3. Nierfalen

Door nierinsufficiëntie verlengt de halfwaardetijd van vrije lichte ketens van 2-6 uur naar 1-2 dagen. De concentratie van de vrije lichte ketens in het serum stijgt. Aangezien beide lichte ketens in gelijke mate stijgen, blijft de ratio onveranderd.

9 detectie van monoclonale proteïnen in sera m.b.v. Freelite^{FM} versus totale concentratie van kappa en lambda

De sensitiviteit van serum VLK assays en totale kappa en lambda assays werd vergeleken door Bossuyt et al. Zestien serum stalen van patiënten met light chain myeloma werden geanalyseerd. Totale concentraties van kappa en lambda werden gemeten met de Beckman Image nefelometer. De 16 stalen hadden allemaal een abnormale vrije kappa/lambda ratio. Slechts 5 van de 16 hadden een abnormale totale kappa/lambda ratio. [9]

Besluit: de bepaling van de vrije kappa/lambda ratio bij patiënten met light chain disease is een sensitievere methode dan de opvolging van de totale kappa/lambda ratio.

10 vrije lichte ketens in urine

Het is niet aan te raden om vrije lichte ketens in urine te bepalen. (zie ook paragraaf over synthese en metabolisatie van vrije lichte ketens) De excretie van bence-jones proteïnen wordt beïnvloed door heterogene moleculaire vormen van de proteïnen (monomeren, dimeren, fragmenten, polymeren, ...) en is afhankelijk van de nierfunctie. Tevens is de hoeveelheid bence-jones niet gerelateerd aan de tumormassa. [24]

Conclusies uit literatuur

Freelite^{FM} is geen screening voor monoclonale gammopathies! MGUS patiënten zullen vaak een normale kappa/lambda ratio hebben. Patiënten met een intact immunoglobuline multiple myeloma kunnen een normale kappa/lambda ratio hebben zijn. Multiple myeloma's met enkel heavy chain secretie zullen per definitie gemist worden. Voor **diagnose en follow-up van light chain disease patiënten** is de bepaling van vrije lichte ketens in het serum nuttig.

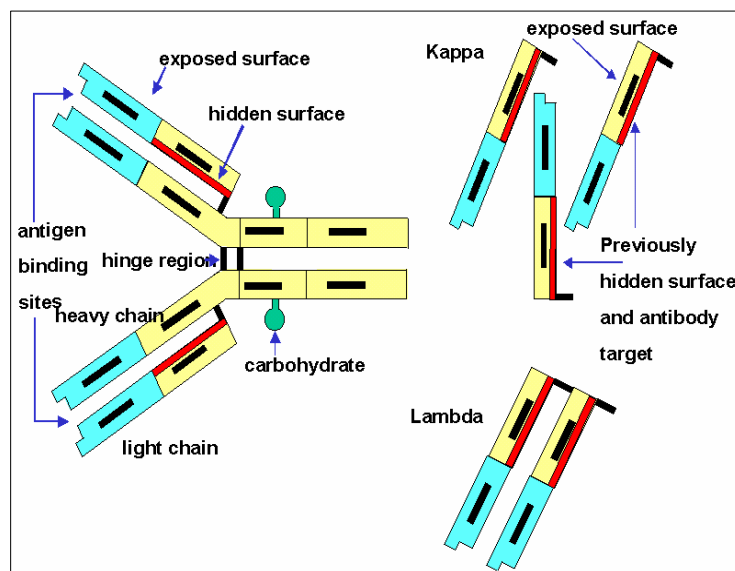
Vrije lichte keten bepaling in het serum voor **diagnose en monitoring van ziekte** kan nuttig zijn voor **amyloidosis** en **niet-secretoir myeloma**, dit zijn echter zeldzame ziektebeelden.

Een ander voordeel van lichte keten bepaling is dat er geen urinestaal nodig is, was soms een probleem kan zijn bij patiënten in anurie.

2. Welke laboratoriumtest kan gebruikt worden voor de bepaling van vrije lichte ketens in het serum?

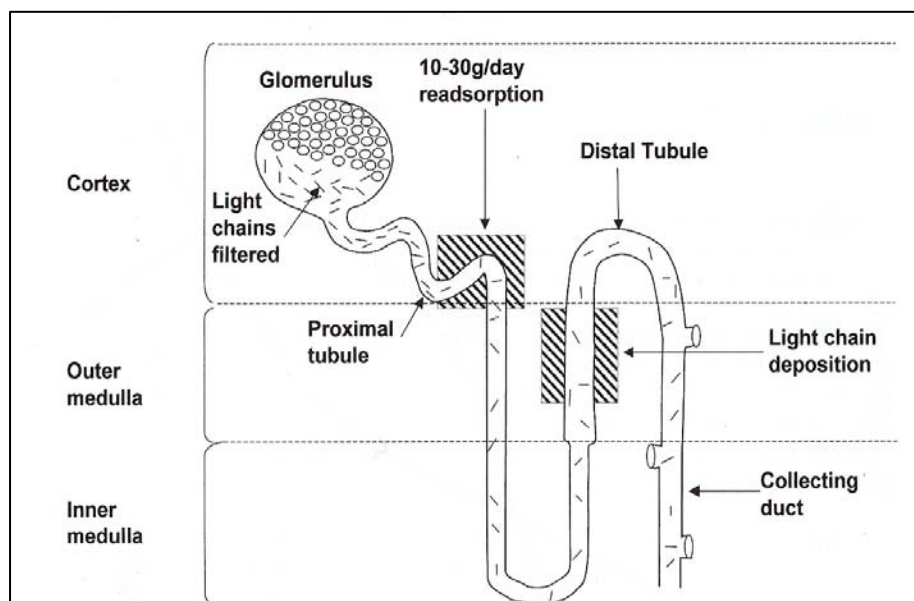
Freelite^{FM} is een immunologische test die toelaat om vrije lichte ketens te kwantificeren. Op heden wordt vaak het totale aantal lichte ketens bepaald, dus zowel de vrije als de gebonden fractie met behulp van immunochemische technieken (o.a. IMMAGE).

Antistoffen die alleen met vrije lichte ketens reageren worden op latexpartikels gefixeerd. De latexpartikels vormen aggregaten indien ze in contact komen met vrije lichte ketens in serum of urine. Deze 'troebeling' in de cuvet kan turbidimetrisch gemeten worden. Het polyclonaal antiserum dat gebruikt wordt is specifiek gericht tegen de verborgen epitopen van de vrije lichte ketens. Er zou geen significante kruisreactiviteit zijn met gebonden lichte ketens.



De translatie van mRNA van de zware ketens en de lichte ketens in de plasmacellen gebeurt apart. In het endoplasmatisch reticulum worden ze dan samengebracht. Er worden meer lichte ketens dan zware ketens geproduceerd. De immunoglobulines en de vrije lichte ketens worden in het bloed gesecreteerd. De nier elimineert lichte ketens in het bloed door filtratie. De lichte ketens worden geabsorbeerd door de proximale tubuli. Ter hoogte van de distale tubuli worden er enige lichte ketens gesecreteerd door het mucosale oppervlak (voornamelijk de urethra). In normale omstandigheden bevat de urine dus een kleine hoeveelheid lichte ketens en tevens andere serumproteïnen. Kappa lichte ketens (monomeren) filtreren drie keer sneller dan lambda lichte ketens (dimeren). Daardoor is de concentratie van lambda lichte ketens in het serum hoger dan de concentratie kappa lichte ketens. In de urine geldt het omgekeerde.

Bij toenemende tumormassa, zoals bij een Bence-Jones myeloma zal de concentratie lichte ketens in het serum stijgen. De lichte ketens concentratie in de urine zal pas toenemen indien de absorptiecapaciteit overschreden wordt. Gezien de Bence Jones proteïnen eerst in het serum verschijnen en pas veel later in het serum, is de bepaling van lichte ketens in het **serum** nuttig voor de vroegtijdige diagnose en opvolging!



Figuur 2: metabolisatie lichte ketens

3. Evaluatie Freelite^{FM}

1 Doelstelling

Het doel van deze studie is het evalueren van de bepaling van vrije lichte ketens in het serum met behulp van FreeliteTM reagens. Hiervoor werden 26 serumstalen van patiënten getest op de aanwezigheid van vrije lichte ketens in serum en vergeleken met traditionele technieken. Tenslotte wordt er een kostenvergelijking gemaakt tussen de huidige manier van werken en de bepaling van vrije lichte ketens.

2 Studiemateriaal

a) toestel

Voor het testen van de Freelite^{FM} kit gebruiken we de IMMAGE van Beckman.

b) de kit

De kit bestaat uit een kalibratorset, een latexreagens, een normale en een hoge controle, gedestilleerd water en een aanvullend reagens.

De kit moet op 2-8°C bewaard worden. De houdbaarheidsdatum staat vermeld op de kit. Na oplossen van het gelyofiliseerd reagens met water is het nog twee weken houdbaar. De kalibratoren en de controles zijn tot één maand na de opening houdbaar mits er voorkomen wordt dat verdamping of besmetting optreedt.

c) staalverzameling

Men gebruikt 32 diepgevroren serumstalen. Stalen mogen bewaard worden op een temperatuur van 2-8°C gedurende 72 uur. Voor een langere bewaartijd kunnen de stalen het best op een temperatuur van -20°C of lager bewaard worden.

d) preparatie van de reagentia

De gelyofiliseerde reagentia moeten worden gereconstitueerd in 3,5 ml gedestilleerd water. Na toevoeging van het water moet men de oplossing 30 minuten laten staan vooraleer er verder gewerkt mag worden.

e) referentiewaarden

Freelite ^{FM}	Serum	Urine
Kappa LC	3,60 - 15,9 mg/L	0,36 - 20,3 mg/L
Lambda LC	8,10 - 33,0 mg/L	0,80 - 17,3 mg/L
Kappa/Lambda ratio	0,60 (bereik van 0,36 tot 1,0)	1,85 (bereik van 0,46 tot 4,0)

Totale nefelometrische bepaling	Serum
IgG	639-1849 mg/dl
IgA	70-312 mg/dl
IgM	56-352 mg/dl
Kappa LC	574-1276 mg/dl
Lambda LC	269-638 mg/dl
Kappa/Lambda ratio	1,47-2,95 mg/dl

3 resultaten

Intact immunoglobuline

- We analyseerden 8 serumstalen van patiënten met een intact immunoglobuline van het type Lambda (Multiple Myeloma (n=4), MGUS (n=3), B-NHL (n=1)). Zie figuur I in bijlage

Zes hiervan hadden een gedaalde vrije kappa/lambda ratio. Twee stalen met een normale ratio hadden volgende kenmerken:

	Staal met ratio 0,877 (nl)
Electroforese	M-piek
Immunofixatie	IgM Lambda
Plasmocyten in beenmerg	4,5%
Nefelometrische totale immunoglobuline bepaling	Verdubbeling van de waarde voor IgA, normale waarden voor IgM en IgG

	Staal met ratio 0,5111 (nl)
Electroforese	Niet uitgevoerd
Immunofixatie op serum	IgG kappa en IgA Lambda
Immunofixatie op urine	IgA Lambda
Plasmocyten in beenmerg	5%
Nefelometrische totale immunoglobuline bepaling	Niet uitgevoerd

- We analyseerden 14 serumstalen van patiënten met een intact immunoglobuline van het type Kappa (Multiple Myeloma (n=5), MGUS (n=7), B-NHL (n=1), Waldenstrom (n=1)). Zie figuur II in bijlage

Op één staal na waren alle vrije kappa/lambda ratio's verhoogd. Dat staal gaf een hoognormale ratio (0,995) en had volgende kenmerken:

	Staal met ratio 0,995 (nl)
Electroforese	M-piek
Immunofixatie serum	IgG Kappa
Immunofixatie urine	Negatief
Plasmocyten in beenmerg	0,5%
Nefelometrische totale immunoglobuline bepaling	Niet uitgevoerd

Light chain disease

- Twee onderzochte serumstalen van een patiënt met light chain disease type lambda vertoonden duidelijk een gedaalde vrije kappa/lambda ratio. Zie figuur III in bijlage

	Staal 1	Staal 2
Vrije kappa/lambda ratio	0,028 (↓)	0,03 (↓)
Electroforese	Versterkte applicatie	Ontdubbeling alfa-2 zone
Immunofixatie op serum	VLKL	VLKL
Immunofixatie op urine	Niet uitgevoerd	Niet uitgevoerd

Nierinsufficiëntie

- Eén staal van een patiënt met nierinsufficiëntie werd onderzocht. Zoals verwacht was zowel kappa als lambda verhoogd, zodat de vrije kappa/lambda ratio (0,634) binnen de normale grenzen lag.

	Staal met ratio 0,634 (nl)
Electroforese	Oligoclonale bandjes in de gamma zone
Immunofixatie op serum	Oligoclonale bandjes
Plasmocyten in beenmerg	0%
Nefelometrische totale immunoglobuline bepaling	IgA lichtjes verhoogd Kappa/ lambda ratio lichtjes verlaagd

Vrije kappa/lambda ratio versus totale kappa/lambda ratio

We maakten tevens een vergelijking tussen de vrije kappa/lambda ratio en de totale kappa/lambda ratio. Zie figuur IV en V in bijlage

Vier stalen van patiënten met multiple myeloma (IgA lambda (n=1), IgG lambda (n=2); IgA kappa (n=1)), één staal van een patiënt met MGUS (IgG lambda) en een staal van een patiënt met nierinsufficiëntie werden uitgetest. Alle stalen behalve die van de patiënt met nierinsufficiëntie gaven een gestoorde vrije kappa/lambda ratio.

	Multiple myeloma (n=4)		Nierinsufficiëntie (n=1)		MGUS (n=1)	
	Nl ratio	Abnl ratio	Nl ratio	Ratio ↓	Nl ratio	Abnl ratio
Vrije ratio		4	1			1
Totale ratio		41		1		1

4 bespreking resultaten (zie figuur VI in bijlage)

	NHL (n=2)		Waldenstrom (n=1)		Multiple Myeloma (n=9)		MGUS (n=10)	
	NL ratio	Gestoord e ratio	NI ratio	Gestoord e ratio	Normale ratio	Gestoord e ratio	Normale ratio	Gestoord e ratio
IEF Serum Lambda (n=8)	0	1	/	/	0	4	2	1
IEF Serum Kappa (n=14)	0	1	0	1	0	5	1	6

Op een totaal van 22 patiëntensera met een intact immunoglobuline waren er slechts drie met een normale ratio. Dit waren stalen van patiënten met MGUS. Aangezien deze patiënten geen therapie behoeven, heeft dit geen klinische implicaties. Toch is het wenselijk deze patiënten op te volgen om transformatie naar een maligne monoclonale gammopathie te detecteren. Deze gegevens tonen in 86% van de gevallen een gestoorde ratio.

De onderzochte stalen (n=2) van een patiënt met light chain disease hadden een zeer duidelijk gestoorde vrije kappa/lambda ratio, wat aansluit bij de beschikbare literatuurgegevens.

Er was een goede correlatie tussen de bevindingen van de totale kappa/lambda ratio en de vrije kappa/lambda ratio. Bij de patiënt met nierinsufficiëntie verwachtten we een normale ratio, de totale ratio was echter gedaald.

Besluit:

Alle onderzochte stalen (n=9) van patiënten met een **multiple myeloma** hadden een gestoorde ratio.

We hebben geen onderzoek gedaan naar de prognostische waarde hiervan.

Zeven van de tien stalen van patiënten met MGUS hadden een abnormale ratio.

4. Financiële implicaties

1 reagentiakost huidige technieken

De prijzen weergegeven in de tabel zijn exclusief de werkuren.
De testen worden volledig terugbetaald.

	Prijs reagentia per test (in euro)
Electroforese serum	1,6
Electroforese urine	1,9
Immunofixatie serum	10,375
Immunofixatie urine	13,525

2 kostenbespreking Freelite^{FM}

De aankoopprijs van Freelite^{FM} is 550 euro. Dit is de prijs voor 2 x 50 testen. Aangezien we 2 kits moeten kopen (kappa en lambda) wordt dit 1100 euro.

De prijs per patiënt is dan 11 euro. Hierbij komen ook nog de kosten van de controles en de kalibraties. Er moet ook rekening gehouden worden met de prijs van de cuvetten. Deze moeten regelmatig vervangen worden. De cuvetten moeten immers helder blijven aangezien dit een nefelometrische techniek is.

Bovendien dienen er vaak verdunningen gemaakt te worden gezien het beperkte meetbereik. De prijs die de patiënt moet betalen zal hoger liggen omdat de werkuren ook nog niet verrekend zijn. De houdbaarheid van de 2 x 50 testen is zes maanden. Eens opgelost zijn de reagentia beperkt houdbaar.

Er is op dit moment nog geen terugbetaling voorzien voor deze test

Besluit: Freelite^{FM} is een dure test!

8. Voorstel en actiepunten

We vinden voldoende argumenten in de literatuur en in de evaluatie van een patiënt met **light chain disease** om Freelite^{FM} een plaats te geven in de diagnostiek en opvolging van deze ziekte.

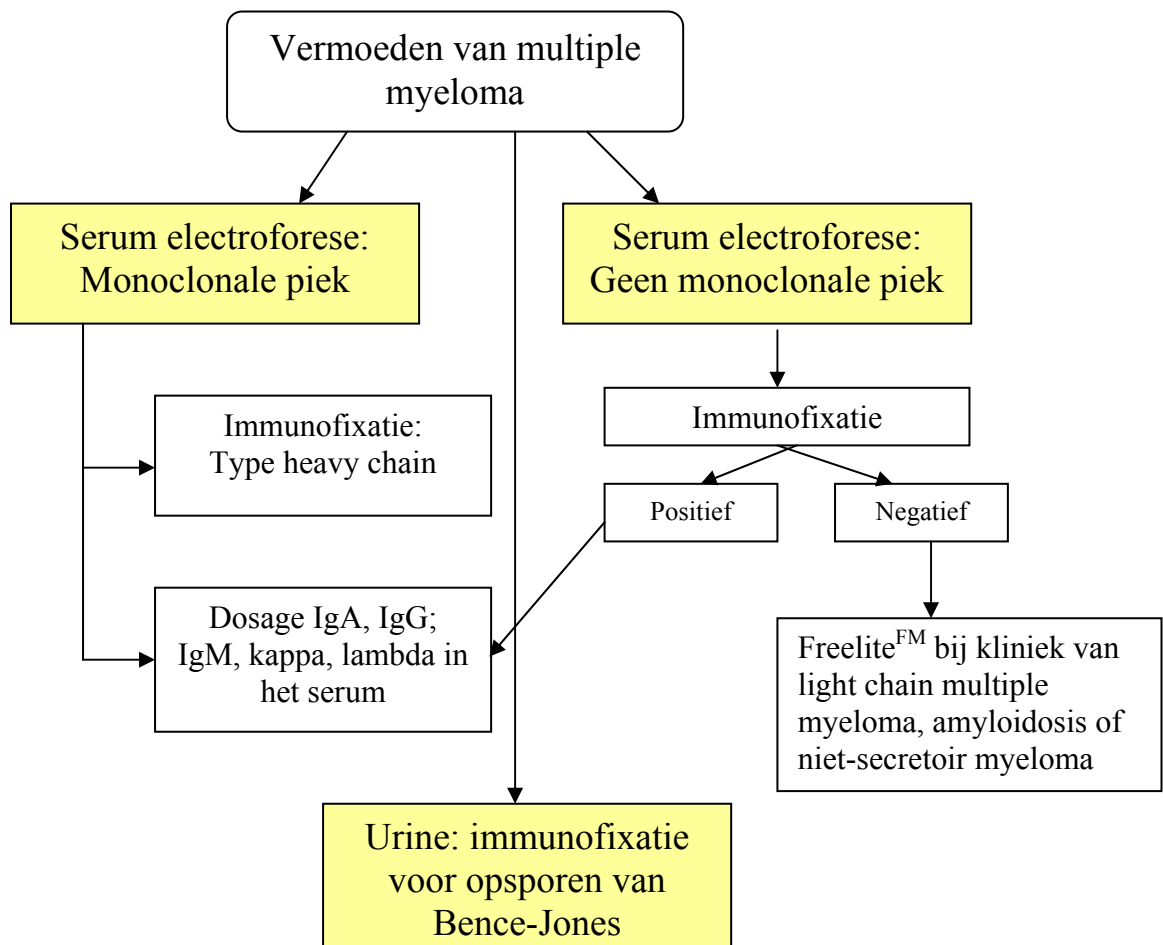
Aangezien de traditionele technieken ons in de steek laten voor de diagnose van **niet-secretoir myeloma**, kan freelite^{FM} ook hier een hulp zijn. Voor deze zeer zeldzame ziekte verwijzen we naar literatuurgegevens.

Tevens heeft de literatuur ons voldoende overtuigd om Freelite^{FM} te gebruiken in het kader van diagnose en opvolging van amyloidosis.

Wat multiple myeloma betreft kunnen we met onze gegevens niet aangeven of Freelite^{FM} een meerwaarde heeft tegenover immunofixatie. Daarvoor zouden we de beide technieken blind moeten vergelijken, nu zijn we immers uitgegaan van positieve stalen voor immunofixatie. Volgens literatuurgegevens kan de vrije kappa/lambda ratio eventueel gebruikt worden voor monitoring van multiple myeloma. Dit zouden we in een volgend stadium nog kunnen uittesten.

Verder zouden we ook nog moeten nagaan of we 'kosten - baten' voldoende testen kunnen doen met het voorgestelde schema. (zie bijlage) Merk op dat ondertussen de kit verbeterd is met aangepaste referentiewaarden en bovendien zijn er nu vloeibare reagentia beschikbaar ter vervanging van de gelyofiliseerde.

Algoritme bij vermoeden van multiple myeloma:



Bij opvolging van amyloidosis, niet-secretoir myeloma of light chain disease stellen we volgend schema voor:

