

16. Paulose-Ram R, Hirsch R, Dillon C et al. Prescription and non-prescription analgesic use among the US adult population: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2003;12:315-26.
17. Porteous T, Bond C, Hannaford P et al. How and why are non-prescription analgesics used in Scotland? *Fam Pract* 2005;22:78-85.
18. Turunen JH, Mantyselka PT, Kumpusalo EA et al. Frequent analgesic use at population level: prevalence and patterns of use. *Pain* 2005;115:374-81.
19. Hansen DL, Hansen EH, Holstein BE. Using analgesics as tools: young women's treatment for headache. *Qual Health Res* 2008;18:234-43.
20. Ademi Z, Turunen JH, Kauhanen J et al. A comparison of three questionnaire-based measures of analgesic use over 11 years in adult males: a retrospective analysis of data from a prospective, population-based cohort study. *Clin Ther* 2007;29:529-34.

## Bestemmelse af lette kæder i serum

Læge Charlotte Toftmann Hansen, bioanalytiker Lars Nielsen, overlæge Anna-Marie Münster & overlæge Niels Abildgaard

### STATUSARTIKEL

Esbjerg Sygehus, Hæmatologisk Afsnit og Klinisk Biokemisk Afdeling, og Odense Universitetshospital, Hæmatologisk Afdeling

I 1847 beskrev *Henry Bence Jones* et unikt protein i urinen hos en patient med knoglesmerter og patologiske frakturer [1]. *Edelman & Gally* demonstrerede i 1962, at dette protein var identisk med immunglobulinets lette kæde [2]. Frie lette kæder (FLC) er den første beskrevne tumormarkør i historien.

Bestemmelse af FLC i blodet er første gang rapporteret i 1965 af *Tan & Ebstein* [3]. Metoden til bestemmelse af FLC er siden udviklet i takt med bedre analytiske teknikker. I 2001 kom det første kommercielle assay (*The Binding Site Ltd.*, Storbritannien) til måling af frie lette kæder i serum (sFLC) på markedet [4]. Anvendelsen af analysen er stigende i takt med en øget dokumentation for analysens nytteværdi. Serum-FLC-analysen supplerer de nuværende diagnostiske redskaber ved monoklonale sygdomme, men analysen kan ikke erstatte urinelektroforesen, der sammen med serum proteinelektroforesen fortsat er de centrale elementer i diagnostisk og responsvurdering ved de monoklonale plasmacellesygdomme. Analysens rolle i forbindelse med diagnostik og monitorering af plasmacellesygdomme er under pågående evaluering. Der er flere uafklarede aspekter ved brug af analysen, herunder præanalytiske, analytiske og postanalytiske forhold, hvilket har været medvirkende til en vis skepsis og tilbageholdenhed med at indføre analysen. Med baggrund i den foreliggende dokumentation anno 2009 har *International*

*Myeloma Working Group* [5] følgende fire nøgle-rekommandationer for brugen af sFLC:

1. sFLC i kombination med serumproteinelektroforese og immunfiksationselektroforese (IFE) er sufficient i screeningen af patienter, der er under mistanke for monoklonal sygdom undtagen ved mistanke om amyloidose, hvor der fortsat bør foretages IFE på døgnurin. Det er en styrkelse af den diagnostiske sikkerhed at kunne udelade målinger på døgnurin, idet resultaterne fra flere kliniske studier viser, at helt op mod 40% af patienterne aldrig får afleveret en sådan [6].
2. sFLC bør tages på diagnosetidspunktet hos alle patienter med monoklonal gammopati af ukendt betydning (MGUS), *smouldering* og symptomatisk myelomatose, solitært plasmacytom og primær AL-amyloidose, idet *baseline*-FLC-niveauet er af prognostisk værdi. Resultater fra flere kliniske studier viser, at en abnorm ratio mellem  $\kappa$ - og  $\lambda$ -kæder ( $\kappa/\lambda$ -ratio) på diagnosetidspunktet af ovenstående plasmacellesygdomme er associeret med advers prognose [7].
3. Serielle målinger af sFLC bør foretages rutinemæssigt hos patienter med AL-amyloidose, oligo- og nonsekretorisk myelomatose, såfremt der præterapeutisk er abnorm  $\kappa/\lambda$ -ratio. Tidligere har specielt patienter med nonsekretorisk myelomatose været vanskelige at diagnosticere og monitorere, idet der ikke har været noget let tilgængeligt diagnostisk redskab. Monitoreringen har været baseret på klinik og gentagne knoglemarvsundersøgelser. Undersøgelser har vist, at ca. to tredjedele af disse patienter har en forhøjet koncentration eller abnorm  $\kappa/\lambda$ -ratio [8].
4. sFLC bør tages hos myelomatosepatienter, der er i komplet remission (CR) efter kemoterapeutisk behandling til bestemmelse af stringent CR. CR



### FORKORTELSER

CR = komplet remission.  
 CV = variationskoefficient.  
 IFE = immunfiksationselektroforese.  
 MGUS = monoklonal gammopati af ukendt betydning.  
 sFLC = frie lette kæder i serum.

bestemmes ud fra normalisering af knoglemarv og M-komponent [9]. Resultaterne fra flere undersøgelser tyder på, at en vedvarende abnorm  $\kappa/\lambda$ -ratio på tidspunktet for CR er et advars prognostikum, der formentlig kan tages som udtryk for minimal restsygdom.

## FYSIOLOGI

Immunglobulin er symmetrisk opbygget af to tunge kæder og to lette kæder. De tunge kæder navngiver immunglobulinklassen. I blodet udgøres størstedelen af immunglobulin (Ig) af type IgA, IgG og IgM. Hvert immunglobulin udtrykker herudover en let kæde, enten  $\kappa$  eller  $\lambda$ . De lette kæder dannes i plasmacellerne, ca. 500 mg/døgn. For at sikre dannelsen af intakt immunglobulin er der en let overproduktion af lette kæder, hvilket resulterer i en intracellulær pool af frie lette kæder, se **Figur 1**. De lette kæder er små molekyler med en molekylvægt på ca. 22.000 g/mol.  $\kappa$  findes typisk som monomer,  $\lambda$  som dimer. Der forekommer højere polymere former af begge kæder [10].

FLC filtreres frit gennem nyrens glomeruli, hvorefter der sker en næsten komplet absorption i nyrens proksimale tubuli. Halveringstiden er kort, 2-6 timer. Nyrens absorptive kapacitet er stor, 10-30 g/døgn [10].

## PATOLOGI

Abnorme koncentrationer af sFLC ses i en række kliniske situationer, herunder ved tilstande med immunsupprimering, immunaktivering, nedsat nyrefunktion samt monoclonale plasmacellesygdomme. Hos patienter med de tre førstnævnte tilstande er der som regel en normal  $\kappa/\lambda$ -ratio, mens balancen mellem sekretionen af de to kæder er forstyrret ved de monoclonale plasmacellesygdomme [11, 12].  $\kappa/\lambda$ -ratioen er derfor essentiel i diagnostikken og bestemmelsen af klonal sygdom.

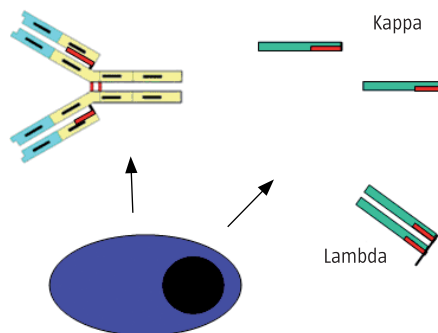
## SERUM-FLC-ANALYSEN

Serum FreeLite, Free Kappa & Free Lambda assay er kommercielt tilgængelige assays. Analysen baserer sig på antiserum, der indeholder polyklonale antistoffer. Assayet indeholder to separate målinger, der direkte kvantiterer henholdsvis  $\kappa$  og  $\lambda$ . Hvis der findes et relativt overskud af en af de lette kæder, udtrykt ved en abnorm  $\kappa/\lambda$ -ratio, mistænkes en monoclonal overproduktion. Analysen foregår via immunonefometri og kan udføres på en række automatiserede laboratorieapparater [4].

Der er en række generelle problemer for antistof-baserede, immunkemiske metoder, herunder analysens nøjagtighed, specificitet og reproducerbarhed

**FIGUR 1**

Plasmacellen producerer lette kæder. De lette kæder findes som en del af det intakte immunglobulin og frit i serum. Kappa optræder typisk som monomer, mens lambda optræder som dimer. Antisensitet ved analysen Serum FreeLite, Free Kappa & Free Lambda assay er markeret med rødt, og som det fremgår, er dette gemt på indersiden af de lette kæder, når de er bundet i immunglobulinet, mens det er tilgængeligt for antistof, når kæderne optræder frit i serum.



[13]. De mere tekniske detaljer omkring analysen gennemgås i det følgende.

## PRÆANALYTISKE FORHOLD

### Prøvetagningsmedie

sFLC bestemmes i serum eller plasma. Der er opnået sammenlignelige resultater af FLC i serum og citrat [14] eller lithium-heparin-plasma [12]. Der er ingen oplysninger af hvilke serumglas, der er anvendt. De mest brugte prøvetagningsmedier i Danmark er gel- eller tørglas. Der er ikke dokumentation for, at resultaterne herfra er sammenlignelige. Vi forventer dog umiddelbart, at analyseresultaterne er sammenlignelige i disse to glas, idet der ikke er tilsat substanser, der burde påvirke resultatet.

### Opbevaring

Er de frie lette kæder stabile? Formentlig er de særdeles stabile. I urin er stabiliteten velundersøgt, FLC er stabile ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  i op til to år [15]. I serum foreligger der blot små studier, men også her finder man FLC-værdier, der er sammenlignelige. Stabiliteten er undersøgt ved opbevaring ved  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  og  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  [14, 16]. Det er relevant for patienterne, at der kan tages blodprøver i nærmiljøet, som dernæst kan sendes til en biokemisk afdeling til analyse. Stabiliteten af sFLC ved høje temperaturer, som kan modsvare postforsendelse om sommeren, er dårligt belyst.

### Interferens

De lette kæders heterogene natur medfører, at der er



TABEL 1

Repræsentative sensitivitsniveauer for hyppigt anvendte målinger af frie lette kæder i serum.

	Kappa, mg/l	Lambda, mg/l	Klonalitet
Serumproteinelektroforese	500-2.000	500-2.000	Monoklonalt bånd på gel
Immunfiksationselektroforese	150-500	150-500	Monoklonalt bånd på gel
Frie lette kæder (FreeLite, Free Kappa & Free Lambda assay)	1,5	3	Abnormt forhold mellem frie kappa- og frie lambdakæder

forskel på antigenudtrykket på den enkelte lette kæde. Dette gør præcis kvantitativ måling vanskelig. Serum indeholder både frie lette kæder samt kæder, der er bundet til det intakte immunglobulin. Sidstnævnte udgør langt den største andel. Er der derfor blot en lille grad af krydsreaktivitet, vil dette have stor indflydelse på det samlede resultat af sFLC. Antistoffet er dog fundet at være specifikt med kun minimal krydsreaktivitet med det intakte immunglobulin [4].

Der er undersøgt for interferens med bilirubin, hæmoglobin og triglycerid, der ikke påvirker analyseresultatet nævneværdigt [4]. Infektion medfører en aktivering af plasmacellens dannelse af antistof. Man vil derfor kunne forvente, at infektion med forhøjelse af C-reaktivt protein vil kunne påvirke niveauet af FLC. Men hvordan og hvor meget er ikke undersøgt.

Tilstedeværelse af specielt reumafaktor, kuldeagglutiner i serum og andre uspecifikke antistoffer vil ofte kunne påvirke resultatet af en antistofbaseret analyse, idet proteinerne er i stand til at binde sig til mange *antigen sites*. Dermed vil man eventuelt kunne

få en falsk forhøjet FLC-koncentration ved tilstedeværelse af sådanne proteiner. Der foreligger ingen undersøgelser, der belyser dette forhold.

### Biologisk variation

Der mangler undersøgelser til bestemmelse af døgnvariation samt dag til dag-variation hos raske såvel som syge (mono- og polyklonal plasmacelleaktivering). Dette er nødvendigt for at afklare, om der er brug for at indføre standarder for prøvetagning. Det bidrager endvidere til belysning af analysens samlede variation.

### ANALYTISKE FORHOLD

FLC-assayet er ikke standardiseret, idet der ikke findes internationalt referencemateriale.

Analysen er sensitiv og måler antigen ned til 2-3 mg/l [4], se **Tabel 1**.

### Impræcision

Impræcisionen er generelt god, med en variationskoefficient (CV) på mindre end 10% for frit  $\kappa$  i intervallet 7-144 mg/l og for frit  $\lambda$  i intervallet mellem 15-227 mg/l [4, 12]. Mange patienter har dog serumværdier, der ligger langt uden for dette interval, op til 10.000 mg/l. Variationen bør være kendt i hele det analytiske spektrum.

Antisera er baseret på polyklonalt antistof, og det eksakte indhold i de forskellige reagent-loter kan derfor variere. Når impræcision er bestemt på tværs af forskellige loter, findes der en væsentligt højere CV, med en lot til lot-variation for  $\kappa$  og  $\lambda$  på henholdsvis 19 og 20%. Det påvirker også  $\kappa/\lambda$ -ratio, med en CV på 25% (3-45%) [17].

### Antigen excess

Et velkendt problem ved den nefelometriske teknik, specielt ved en analyse med stort analysespektrum, er muligheden for antigen excess. Et fænomen der gør, at meget høje koncentrationer af FLC kan undervurderes [18]. Problemet imødegås ved at starte med en fortynding på 1:100. Endvidere anbefales det, at ethvert klinisk mistænkeligt resultat efterfølges af gentagen analyse ved en højere fortynding. Disse foranstaltninger, samt erfarent personale, løser delvist problemet.

### POSTANALYTISKE FORHOLD

#### Referenceinterval

Referenceintervallet er fastlagt. *Katzmann et al* [11] har undersøgt sFLC på 273 raske personer (donorer) i alderen 21-90 år. I flere studier har man dog senere fundet betydelige forskelle i referenceintervallet. Specielt afhænger dette af, hvilket laboratorieappara-



### FAKTABOKS

Frie lette kappa- og lambdakæder i serum (sFLC) bruges som tumormarkør ved klonale plasmacellesygdomme, primært myelomatose.

Relativt overskud af en af de lette kæder, udtrykt ved abnorm  $\kappa/\lambda$ -ratio, giver mistanke om klonalitet

Abnorme koncentrationer af sFLC ses ved tilstande med immunsupprimering, immunaktivering, nedsat nyrefunktion og klonale plasmacellesygdomme.

Der er international konsensus om følgende rekommandationer for brug af sFLC-analysen:

1. Ved udredning af patienter, der er mistænkt for klonal B-celle-sygdom. Kombineres med serumproteinelektroforese og immunfiksationselektroforese (IFE). Ved mistanke om primær AL-amyloidose bør der fortsat foretages IFE på døgnurin.
2. sFLC på diagnosestidspunktet er en ugunstig prognostisk markør for patienter med monoklonal gammopati af ukendt betydning, myelomatose, plasmacytom og AL-amyloidose.
3. Serielle målinger bør foretages rutinemæssigt hos patienter med AL-amyloidose, oligo- og non-sekretorisk myelomatose, såfremt der præterapeutisk er abnorm  $\kappa/\lambda$ -ratio.
4. sFLC bør måles som led i remissionsvurdering efter behandling, idet svaret nu indgår i de internationale responskriterier, herunder i definitionen af såkaldt stringent komplet remission.

tur der anvendes, men selv på samme apparatur, er der væsentlige forskelle [19]. sFLC hos raske personer stiger med alderen [11], dette skyldes formentlig både tiltagende produktion af immunoglobulin og reduceret tubulær reabsorption af lette kæder. Stigningen afspejles ikke i  $\kappa/\lambda$ -ratio, ligesom ændringen udlynes, hvis der korrigeres for Cystatin C (indikator for renal clearance). Det er således af stor betydning, hvordan referencematerialet sammensættes. Det er vigtigt at ekskludere evt. MGUS-patienter, samt personer med uerkendt nyreinsufficiens og subklinisk infektion. Aldersvariation bør inkluderes i referenceintervallet for frit  $\kappa$ , frit  $\lambda$  og  $\kappa/\lambda$ -ratio. Det anbefales at etablere et lokalt referenceinterval [19, 20].

## OPSUMMERING

FLC-analysen udgør potentielt et stort fremskridt i diagnostik, behandling og kontrol af patienter med myelomatose og andre klonale plasmacellesygdomme, specielt når det drejer sig om nonsekretorisk/oligosekretorisk myelomatose og primær AL-amyloidose.

Før sFLC kan anvendes optimalt i den kliniske dagligdag, er det afgørende at få belyst den samlede præanalytiske, analytiske, biologiske og postanalytiske variation. Særligt vigtigt er det at erkende, hvornår en ændring i målt sFLC er udtryk for en reel sygdoms- eller behandlingsrelateret ændring og dermed er klinisk betydende.

**KORRESPONDANCE:** Charlotte Toftmann Hansen, KBA, SVS Esbjerg, 6700 Esbjerg. E-mail: c.toftmann@yahoo.com

**ANTAGET:** 16. oktober 2009

**FØRST PÅ NETTET:** 8. februar 2010

**INTERESSEKONFLIKTER:** Ingen

## LITTERATUR

- Bence Jones H. papers on chemical pathology: lecture III. *Lancet* 1847;ii:88-92.
- Edelman GM, Gally JA. The nature of Bence Jones proteins: chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal  $\gamma$ -globulins. *J Exp Med* 1962;116:202-27.
- Tan M, Ebstein WV. A direct immunologic assay of human sera for Bence Jones proteins (L-chains). *J Lab Clin Med* 1965;66:344-56.
- Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP et al. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem* 2001;47:673-80.
- Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia* 2009;23:215-24.
- Pratt G, Holding S. More studies are needed to assess the performance of serum free light chain measurement for the diagnosis of B-cell disorders in routine clinical practice – response to Vermeersch et al. *BJH* 2008;143:143-50.
- Dispenzieri A, Zhang L, Katzmann JA et al. Appraisal of immunoglobulin free light chain as a marker of response. *Blood* 2008;111:4908-15.
- Drayson MT, Tang LX, Drew R et al. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood* 2001;97:2900-2.
- Durie BGM, Harousseau JL, Miguel JS et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006;20:1467-73.
- Levinson SS, Keren DF. Free Light Chains of Immunoglobulins: Clinical Laboratory Analysis. *Clin Chem* 1994;40:1869-78.
- Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS 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;48:1437-44.
- Tate JR, Gill D, Cobcroft R et al. Practical Considerations for the Measurements of Free Light Chains in Serum. *Clin Chem* 2003;49:1252-7.
- Nakano T, Miyazaki S, Takahashi H et al. Immunochemical quantification of free immunoglobulin light chains from an analytical perspective. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:522-32.
- Smith LJ, Long J, Carr-Smith HD et al. Measurement of immunoglobulin free light chains by automated homogeneous immunoassay in serum and plasma samples. *Clin Chem* 2003;49:No.D-58, pA106.
- Tencer J, Thysell H, Andersson K et al. Stability of albumin, protein HC, immunoglobulin G,  $\kappa$  and  $\lambda$ -immunoreactivity, orosomucoid and  $\alpha$ 1-antitrypsin in urine stored at various conditions. *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54:199-206.
- Smith LJ, Long J, Matters DJ et al. Sample storage and stability for free light chain assays. *Clin Chem* 2003;49:A105-A106.
- Tate JR, Mollee P, Diemski G et al. Analytical performance of serum free light chain assay during monitoring of patients with monoclonal light-chain diseases. *Clin Chim Acta* 2007;376:30-6.
- Daval S, Tridon A, Mazeron N et al. Risk of antigen excess in serum free light chain measurements. *Clin Chem* 2007;53:1985-6.
- Pattenden R, Rogers SY, Wenham PR. Serum free light chains; the need to establish local reference intervals. *Ann Clin Biochem* 2007;44:512-5.
- Urdal P, Piehler A. Måling av frie lette kappa og lambda immunoglobulinkjeder i serum ved diagnostikk og behandling av myelomatose. *Klinisk Biokemi i Norden* 2008;20:16-22.



## DANISH MEDICAL BULLETIN

Det nye nummer af Danish Medical Bulletin er nu tilgængeligt på nettet: [www.danmedbul.dk](http://www.danmedbul.dk)

Vi modtager gerne manuskripter fra danske forfattere, både originalartikler og oversigtsartikler.

### Original articles

- Linear correlation between phenobarbital dose and concentration in alcohol withdrawal patients. *Karen Tangmose, Mogens Kai Nielsen, Peter Allerup et al.*
- Phenobarbital versus diazepam for delirium tremens – a retrospective study. *Ida Hjermø, John Erik Anderson, Anders Fink-Jensen et al.*
- An evaluation of the 18- and 12-month basic postgraduate training programmes in Denmark. *Niels Kristian Kjær, Dorte Qvesel & Troels Kodal*
- Expert opinion on “best practices” in the delivery of health care services to immigrants in Denmark. *Natasja Koitzsch Jensen, Signe Smith Nielsen & Allan Krasnik*

### PhD theses

- Objective determination of Fitzpatrick skin type. *Mette Henriksen Ravnbak*
- Nasal nitric oxide and pulmonary radioaerosol mucociliary clearance as supplementary tools in diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *June Kehlet Marthin*



## JULENUMMER 2010



Ugeskrift for Læger vil gerne i vores julenummer publicere artikler, som er sjove og lettere at fordøje, end almindelige videnskabelige artikler er.

Vi efterspørger derfor artikler, som behandler »skæve« videnskabelige emner, men de skal stadig være opbygget som regelrette artikler, og data må ikke være opdagede. Det kan være originalartikler, kasuistikker, litteraturgennemgange mv. Der er fuldstændig frit emnevalg, så det er bare at gå i gang.

Undtagelsesvis skal disse artikler ikke uploades gennem det elektroniske manuskriptsystem, men sendes direkte på e-mail til [hc@dadl.dk](mailto:hc@dadl.dk)

Redaktionen