

# Screening naar en follow-up van multipel myeloom en gerelateerde plasmaceldyscrasieën

---

## Inleiding

Naar aanleiding van de vernieuwde (2014) definitie<sup>1</sup> van multipel myeloom en verwante aandoeningen zal in deze labomailing het gebruik van verschillende analyses en technieken in het kader van deze plasmaceldyscrasieën aan bod komen.

## Epidemiologie

Het multipel myeloom (MM) – de ziekte van Kahler – is een cytogenetisch heterogene, klonale, proliferatieve plasmacelaandoening die gepaard gaat met de productie van een monoklonaal immuunglobuline. Zo goed als altijd wordt deze voorafgegaan door een asymptomatisch en premaligne stadium genaamd ‘monoklonale gammopathie van onbekend belang’, MGUS.

MGUS is een frequent voorkomende bevinding met een prevalentie van 3-4% bij de populatie boven de 50 jaar. Het risico van progressie naar MM bedraagt +/- 0.5-1% per jaar.

Het smouldering multipel myeloom (SMM) is een intermediair stadium tussen MGUS en multipel myeloom en wordt gekenmerkt door afwezigheid van CRAB-symptomen (hypercalcemie, nierinsufficiëntie, anemie, botletsels), maar met 10-60% plasmacellen in het beenmerg en/of een significante hoeveelheid monoklonale antistof in serum en/of urine. Deze entiteit heeft een groter progressierisico van 10%/jaar gedurende de eerste 5 jaar en 1% per jaar de volgende 15 jaar.

## Kliniek

De maligne plasmacellen woekeren in het beenmerg en zorgen voor extensieve skeletdestructie met osteolytische letsels, osteopenie en pathologische fracturen.<sup>2</sup>

De diagnose wordt vaak vermoed op basis van onderstaande klinische presentaties:

- Botpijnen met lytische letsels op routine RX, meestal in de rug of borst.
- Verhoogd totaal eiwit en/of de aanwezigheid van een monoklonaal eiwit in serum of urine.
- Symptomen suggestief voor maligniteit zoals onverklaarde anemie.
- Hypercalcemie, zowel symptomatisch of als toevallige vondst
- Acuut nierfalen met verhoogd eiwit in urine of zeldzaam met een nefrotisch syndroom door primaire amyloidose.

Ook neurologische aandoeningen ten gevolge van compressie door een paravertebraal plasmocytoom of door een ingedeukte wervel zijn mogelijk. Ten gevolge van immuundysfunctie,

onderdrukking van normale plasmacelfunctie en/of hypogammaglobulinemie vertonen deze patiënten ook een groter infectierisico, voornamelijk met gramnegatieven.

## Nieuwe definitie

Met de komst van nieuwe diagnostische technieken en de resultaten van grote gecontroleerde studies werden eind 2014 door de internationale myeloma working group (IMWG) nieuwe criteria gepubliceerd voor de diagnostiek van multipel myeloom (MM, ziekte van Kahler) en gerelateerde plasmaceldyscrasieën<sup>1</sup>.

De grootste vernieuwing ligt in de inclusie van een aantal 'biomarkers of malignancy' waarvan de aanwezigheid rechtstreeks resulteert in de classificatie van een aandoening als MM, waar dit vroeger een classificatie als smouldering multiple myeloma zou gekregen hebben.

Het therapeutisch arsenaal is sinds de opstelling van de vorige definities in 2003 significant uitgebreid met minder toxische middelen. Hierdoor is het niet langer verantwoord om een behandeling uit te stellen tot er aan de definitie van MM voldaan is (door het optreden van orgaanschade). Deze aanpassing van de definitie moet resulteren in een snellere opstart van adequate therapie.

De definitie van de verschillende entiteiten is schematisch weergegeven in Tabel 1.

Naast MM, SMM en MGUS zijn er ook nog andere plasmaceldyscrasieën zoals het solitair plasmocytoom, POEMS syndroom en AL amyloïdose. Waldenströms macroglobulinemie is een aparte entiteit, behorende tot de lymfomen.

**Tabel 1: gereviseerde criteria van de International Myeloma Working Group voor de diagnostiek van multipel myeloom en smouldering multipel myeloom**

**Revised International Myeloma Working Group diagnostic criteria for multiple myeloma and smoldering multiple myeloma**

Definition of multiple myeloma
<p><b>Clonal bone marrow plasma cells <math>\geq 10\%</math> of biopsy-proven bony or extramedullary plasmacytoma* and any one or more of the following myeloma-defining events:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Evidence of end-organ damage that can be attributed to the underlying plasma cell proliferative disorder, specifically:               <ul style="list-style-type: none"> <li>Hypercalcemia: serum calcium <math>&gt; 0.25</math> mmol/L (<math>&gt; 1</math> mg/dL) higher than the upper limit of normal or <math>&gt; 2.75</math> mmol/L (<math>&gt; 11</math> mg/dL)</li> <li>Renal insufficiency: creatinine clearance <math>&lt; 40</math> mL per min<sup>¶</sup> or serum creatinine <math>&gt; 177</math> <math>\mu</math>mol/L (<math>&gt; 2</math> mg/dL)</li> <li>Anemia: hemoglobin value of <math>&gt; 20</math> g/L below the lower limit of normal, or a hemoglobin value <math>&lt; 100</math> g/L</li> <li>Bone lesions: one or more osteolytic lesions on skeletal radiography, CT, or PET-CT<sup>Δ</sup></li> </ul> </li> <li>Any one or more of the following biomarkers of malignancy:               <ul style="list-style-type: none"> <li>Clonal bone marrow plasma cell percentage* <math>\geq 60\%</math></li> <li>Involved:uninvolved serum free light chain ratio<sup>◇</sup> <math>\geq 100</math></li> <li><math>&gt; 1</math> focal lesions on MRI studies<sup>§</sup></li> </ul> </li> </ul>
Definition of smoldering multiple myeloma
<p><b>Both criteria must be met:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Serum monoclonal protein (IgG or IgA) <math>\geq 30</math> g/L or urinary monoclonal protein <math>\geq 500</math> mg per 24 hours and/or clonal bone marrow plasma cells 10 to 60%</li> <li>Absence of myeloma defining events or amyloidosis</li> </ul>
Definition of monoclonal gammopathy of undetermined significance
<p><b>All three criteria must be met:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Serum monoclonal protein <math>&lt; 30</math> g/L</li> <li>Bone marrow plasma cells <math>&lt; 10\%</math></li> <li>Absence of myeloma defining events or amyloidosis (or Waldenström macroglobulinemia in the case of IgM MGUS)</li> </ul>

PET-CT: <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography with computed tomography.

\* Clonality should be established by showing kappa/lambda-light-chain restriction on flow cytometry, immunohistochemistry, or immunofluorescence. Bone marrow plasma cell percentage should preferably be estimated from a core biopsy specimen; in case of a disparity between the aspirate and core biopsy, the highest value should be used.

¶ Measured or estimated by validated equations.

Δ If bone marrow has less than 10% clonal plasma cells, more than one bone lesion is required to distinguish from solitary plasmacytoma with minimal marrow involvement.

◇ These values are based on the serum Freelite assay (The Binding Site Group, Birmingham, UK). The involved free light chain must be  $\geq 100$  mg/L.

§ Each focal lesion must be 5 mm or more in size.

## Diagnostiek

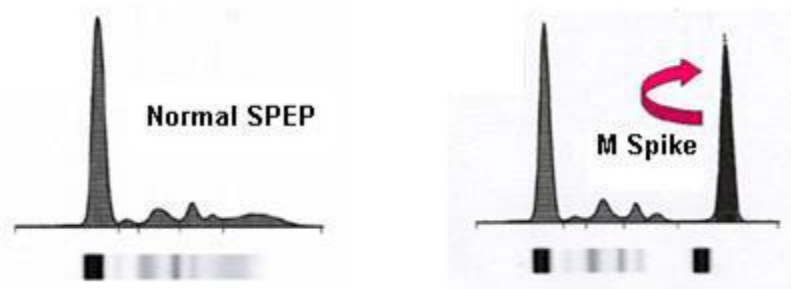
De grote verscheidenheid aan plasmacelaandoeningen en de grote concentratierange van de gesecreteerde eiwitten leidt tot uitdagingen om deze te detecteren. Geen enkele techniek is geschikt om alle vormen te detecteren en monitoren. In deze labomailing zullen we de meest gebruikte en meest aangewezen technieken even toelichten.<sup>3</sup>

## Serumtesten

### Serum eiwitelektroforese (SPE)

Bij een monoklonale gammopathie wordt een monoklonale band in de eiwitelektroforese zichtbaar als een scherp afgelijnde band in het elektroforesepatroon. Meestal bevindt deze zich in de gammafractie, maar ook in de bèta- en zelfs alfa-2 fracties kan een M-piek zich bevinden.

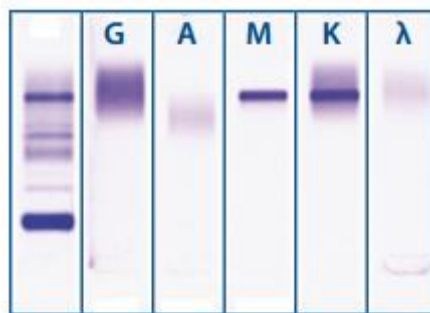
Let op: zelfs bij een normaal totaal eiwit en normale morfologie van de bèta- en gammafracties, zelfs bij normale kwantificatie van de immuunglobulines, kan een monoklonaal eiwit aanwezig zijn. Dit is voornamelijk het geval bij patiënten met light chain MM (LCMM). Door het lage moleculair gewicht van deze lichte ketens worden deze snel gefiltreerd in de nier. Ook kleine hoeveelheden M-proteïne die zich in de betafractie bevinden (vnl. IgA) zijn soms moeilijk op SPE terug te vinden.



Figuur 1: elektroforesepatroon

### Immunofixatie (IFE) - immuunsubstractie

Bij patiënten met een afwijking op elektroforese wordt immunofixatie uitgevoerd teneinde de piek te identificeren. Standaard gebeurt dit met antistoffen tegen IgG, IgM, IgA, kappa en lambda. Indien enkel een lichte keten kan gevisualiseerd worden, wordt verdere immunofixatie uitgevoerd met anti-IgE en anti-IgD.



Figuur 2: voorbeeld van immunofixatie elektroforese met aanwezigheid van een monoklonale band IgM kappa.

De gevoeligheid van IFE is ongeveer 10x hoger dan van SPE (10 mg/dL vs. 100 mg/dL). Een negatieve SPE sluit een M-piek dus niet volledig uit en wordt best aangevuld met IFE. Voor de aanrekening van immunofixatie moet echter rekening gehouden worden met de huidige RIZIV-nomenclatuur. Bij deze test geldt diagnoseregule 8 die bepaalt dat deze enkel mag aangerekend worden indien een abnormale band wordt waargenomen bij de SPE.

Sinds enkele jaren bestaat een nieuwe techniek 'immuunsubstractie' die gebruik maakt van capillaire zone elektroforese (CZE) om de identificatie van M-pieken uit te voeren. Deze wordt ook in het MCH toegepast indien er een duidelijk afwijkend elektroforesepatroon is. Het voornaamste voordeel van deze techniek is de snellere rapporteertijd. Indien er zwakke bandjes worden waargenomen of complexe morfologie van het elektroforesepatroon, wordt de identificatie nog steeds uitgevoerd met immunofixatie.

In het MCH wordt immunofixatie alleen uitgevoerd indien deze werd aangevraagd en een afwijkend elektroforesepatroon werd gedetecteerd (cfr. diagnoseregule 8). Indien u wenst dat dit, ondanks een normaal SPE patroon, toch wordt uitgevoerd mag u steeds het labo contacteren. Indien er zich geen veranderingen voordoen in SPE patroon bij een patiënt met een gekende en geïdentificeerde M-piek, wordt IFE (indien aangevraagd) slechts 1x per jaar uitgevoerd.

### Immuunglobuline kwantificatie

De nefelometrische of turbidimetrische kwantificatie van immuunglobulines wordt niet aangeraden voor de diagnostiek van M-proteïnes aangezien zowel de monoklonale als polyklonale eiwitten worden meegeteld. Ook voor bi- of triclonaal gammopathieën heeft deze techniek geen zin.

Er is wel een rol weggelegd voor deze techniek voor het opvolgen van grote IgM paraproteïnes (> 30g/L) aangezien bij elektroforese een saturatie van de kleurstof optreedt en hierdoor lagere waarden worden gemeten (tot de helft). Voor IgA eiwitten is er meestal een goede correlatie tussen nefelometrie/turbidimetrie en eiwit-elektroforese.

Kwantificatie van immuunglobulines kan wel nuttig zijn voor het diagnosticeren van onderdrukking van de niet-aangetaste Ig-klassen bij patiënten met een paraproteïne.

### Kwantificatie van vrije lichte ketens (FLC) in serum (Bence-Jones eiwitten)

Vrije lichte ketens hebben een molecuulgewicht van +/- 24kDa en bevatten 210-220 aminozuren, bestaande uit een vast en een variabel deel. Deze vrije ketens (eg. niet gebonden aan een zware keten) worden in molaire excess geproduceerd t.o.v. de zware ketens. Vrije kappa circuleren zowel als monomeren, als niet-covalent gebonden dimeren of een mengsel van beide. Vrije lambda ketens circuleren meestal als covalent gebonden dimeren.

Dagelijks wordt ongeveer 500 mg vrije lichte ketens geproduceerd. Het exces wordt in de nier gefiltreerd en geklaard via de urine. Hun halfleven is dan ook een stuk korter (2-6u) dan intacte immuunglobulines.

De assays voor vrije lichte ketens gebruiken antisera gericht tegen epitopen die enkel worden blootgesteld wanneer niet-gebonden aan een zware keten. De aviditeit is van deze antisera voor een vrije keten 10000x hoger dan voor gebonden ketens. De diagnose wordt dan ook gesteld door zowel de vrije lambda als de vrije kappa ketens te kwantificeren en de ratio tussen beide te meten. De mediane FLC k/l ratio is 0.9 (0.26-1.65).

Deze techniek is erg gevoelig voor de detectie van klonale lichte keten aandoeningen. Abnormale ratio's worden aangetroffen bij 100% van de patiënten met LCMM, 80-95% van AL amyloïdose patiënten en 60-70% van de patiënten met niet-secretoire MM. Ze worden echter slechts bij 90-95% van de patiënten met een intact immuunglobuline MM gevonden en slechts bij 40% van de patiënten met MGUS. Aangezien deze laatste 2 patiëntengroepen aantoonbare M-proteïnes hebben met SPE en IFE is duidelijk dat een combinatie van testen nodig is om een maximale gevoeligheid te behalen.

### Serumviscositeit

Meting van de serumviscositeit is aangeraden wanneer er > 40g/L IgM, > 50g/L IgA of > 60 g/L IgG in serum aanwezig is, evenals bij alle patiënten met oromucosale bloedingen, slecht zicht of neurologische symptomen suggestief voor een hyperviscositeitssyndroom (hoofdpijn, vertigo, nystagmus, slecht gehoor, ataxie, paresthesieën, diplopie, somnolentie, stupor of coma).

Deze test raakt echter verlaten en is momenteel nog slechts in een beperkt aantal laboratoria beschikbaar.

## Cryoglobulines

Cryoglobulines zijn eiwitten die neerslaan bij afkoeling en terug oplossen bij verwarming. Ook paraproteïnes kunnen deze activiteit vertonen. Voor de diagnose wordt serum afgekoeld en koel gestockeerd. Na 24u wordt het serum geïnspecteerd op de aanwezigheid van een precipitaat. Indien aanwezig kan dit gewassen worden en verder geanalyseerd en geïdentificeerd.

Waldenströms macroglobulinemie is de meest frequente oorzaak.

Veel patiënten met cryoglobulines zijn echter asymptomatisch terwijl sommige patiënten met kleine cryoglobulines in de range 10-20 g/L zeer ernstige symptomen vertonen zoals pijn, purpura, Raynaudfenomeen, cyanose en zelfs ulceratie van de huid en onderliggende weefsels bij blootstelling aan koude. De temperatuur waarbij de eiwitten neerslaan is de bepalende factor.

## Urine assays

### Dipstick test

Een dipstick test is voornamelijk gevoelig voor albumine en slechts weinig voor monoklonale eiwitten. Een random urinestaal kan omwille van het gebruiksgemak gekozen worden voor een initiële screening, maar voor confirmatie is een 24u-collectie aangewezen. Hiermee kan de basale nierfunctie en de totale eiwitexcretie per dag beoordeeld worden.

### Totaal eiwit in urine

Een gewone meting van het totaal eiwit in urine is onvoldoende aangezien hiermee geen onderscheid kan gemaakt worden tussen enerzijds een nefrotisch syndroom ( $> 3\text{g}/24\text{u}$ ) zoals dit optreedt bij amyloïdose of lichte keten ziekte en anderzijds een myelomapatroon met voornamelijk verlies van een monoklonaal eiwit. Hiervoor is urine-elektroforese en immunofixatie vereist.

### Urine elektroforese en immunofixatie

Bij een IgG MM heeft  $> 75\%$  van de patiënten een monoklonale lichte keten in urine (Bence Jones proteïnurie). Patiënten met een lichte keten MM (LCMM) hebben vaak erg lage concentraties M-proteïne in de circulatie en zeker voor hen is het belangrijk om zowel serum als urine IFE uit te voeren.

Sinds de komst van de serum vrije lichte keten assay is de noodzaak voor het uitvoeren van urine-analyses sterk gedaald. Daarom suggereert de IMWG vandaag de dag om sFLC uit te voeren als onderdeel van het diagnostisch proces in de plaats van urine SPE en IFE.

Als urine-elektroforese wordt uitgevoerd voor monitoring, dient steeds ook een IFE te gebeuren om de klonaliteit van de gevonden bandjes op te sporen. Urineanalyses hebben een groter risico op vals-positieve bandjes op de elektroforese door degradatie en de langere applicatietijd in de gel.

## Screeningspanels

Er werden diverse screeningsstudies uitgevoerd om na te gaan wat het beste diagnostisch panel is voor het opsporen van een plasmaceldyscrasie. Een combinatie van SPE, sIFE, sFLC en uIFE detecteert 98.6% van de gevallen. Zie ook Tabel 2.

Interessant genoeg zorgt het elimineren van urinetesten niet voor een terugval in diagnostische sensitiviteit voor MM, macroglobulinemie, plasmocytoom, POEMS en SMM. Dit heeft in 2014 geleid tot de aanbeveling van de IMWG voor een screeningspaneel van SPE, IFE en FLC. Urineanalyses worden wel aangeraden indien AL amyloïdose wordt verdacht. Het is wel aan te raden om een urineonderzoek uit te voeren eenmaal een M-proteïne werd gediagnosticeerd.

Deze combinatie van screeningstesten vergemakkelijkt de diagnostiek aangezien enkel serum moet worden afgenomen. De Belgische RIZIV-nomenclatuur legt echter beperkingen op: in België wordt IFE enkel terugbetaald indien eerst een afwijkend SPE-patroon werd gevonden (diagnoseregulering 8). Vrije lichte ketens zijn niet terugbetaald in de diagnostische setting maar enkel voor de monitoring van LCMM, niet-secreterend myeloom en primaire amyloïdose. (Kostprijs: B2000 ~ 65€)

**Tabel 2: diagnostische sensitiviteit van diverse combinaties van testen<sup>4</sup>**

Diagnosis	Number of subjects, n	Single assays					Combination of assays	
		SPE, %	Serum IFE, %	Serum FLC, %	SPE+FLC, %	SPE+IFE+FLC; no urine, %	All serum and urine tests, %	
All	1877	79.0	87.0	74.3	94.3	97.4	98.6	
MM	467	87.6	94.4	98.6	100	100	100	
WM	26	100	100	73.1	100	100	100	
SMM	191	94.2	98.4	81.2	99.5	100	100	
MGUS	524	81.9	92.8	42.4	88.7	97.1	100	
Plasmacytoma	29	72.4	72.4	55.2	86.2	89.7	89.7	
POEMS	31	74.2	96.8	9.7	74.2	96.8	96.8	
AL	581	65.9	73.8	88.3	96.2	97.1	98.1	
LCDD	18	55.6	55.6	77.8	77.8	77.8	83.3	

SPE, serum protein electrophoresis; IFE, immunofixation electrophoresis; FLC, free light chains by nephelometry; MM, multiple myeloma; WM, Waldenström's macroglobulinemia; SMM, smoldering multiple myeloma; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; POEMS, polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal protein, skin changes; AL, immunoglobulin light chain primary amyloidosis; LCDD, light chain deposition disease. Adapted from reference [1].

## Monitoring

Eenmaal een M-piek werd ontdekt kan deze fungeren als tumormerker. Er zijn verschillende manieren om deze te kwantificeren. Hoe kleiner het M-proteïne, hoe moeilijker de kwantificatie. Grote M-pieken worden bij voorkeur d.m.v. SPE gekwantificeerd. Ook indien er suppressie is van de andere immuunglobulines kan een kleinere M-piek nog betrouwbaar gemeten worden met SPE.

Naarmate de piek kleiner wordt, wordt het aandeel polyklonaal immuunglobuline groter en daalt de betrouwbaarheid van de kwantificatie.

Wanneer monoklonale IgA of IgM immuunglobulines migreren in de betafractie wordt SPE nog moeilijker omdat ze kunnen verdwijnen onder de piek van transferrine, C3, enz. De IMWG raden aan om de volledige betafractie te kwantificeren als M-piek indien het een IgA M-piek betreft en de betafractie > 20 g/L. Kleinere pieken kunnen gekwantificeerd worden d.m.v. nefelometrie/turbidimetrie.

Er zijn ook nieuwere technieken en reagentia ('Heavylite') beschikbaar die specifiek de combinatie van zware en lichte keten kunnen kwantificeren. De isotype-specifieke kappa/lambda ratio werd



reeds voorgesteld als monitoring tool bij IgA en IgM paraproteïnes. Deze technieken zijn echter niet terugbetaald en gebeuren momenteel niet routinematig in België.

Ook vrije lichte ketens kunnen gebruikt worden als monitoring tool, voornamelijk bij een M-piek < 10g/L of urine M-piek < 200mg/24u. Voorwaarde is wel dat de FLC ratio gestoord is en de betrokken FLC > 100 mg/L bedraagt. Vrije lichte ketens worden in België ook enkel terugbetaald cfr. diagnoseregel 86: “Enkel voor de opvolging van patiënten met primaire amyloïdose, lichte keten myeloom en niet-secreterend myeloom.”

## Besluit

De nieuwe definitie van MM en gerelateerde aandoeningen zorgt voor een snellere diagnostiek en start van de behandeling.

De IMWG stelt als screening voor: SPE+IFE+FLC op serum. De inclusie van vrije lichte ketens zorgt voor eenzelfde diagnostische sensitiviteit als het includeren van SPE+IFE in urine, maar met een makkelijkere preanalytische fase. De Belgische RIZIV-nomenclatuur laat echter geen terugbetaling toe van sFLC in de diagnostische setting en ook serum immunofixatie is slechts terugbetaald indien een afwijkend elektroforesepatroon werd gedetecteerd, ondanks dat deze methode 10x gevoeliger is dan SPE.

## Referenties

- 1 Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V *et al.* International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014; **15**: e538-48.
- 2 Rajkumar SV. Clinical features, laboratory manifestations, and diagnosis of multiple myeloma. In: Kyle RA, Connor RF (eds). *UpToDate*. Wolters Kluwer, 2016.
- 3 Willrich MA V, Katzmann JA. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Clin Chem Lab Med* 2016; **54**: 907–19.
- 4 Katzmann JA. Screening panels for monoclonal gammopathies: time to change. *Clin Biochem Rev* 2009; **30**: 105–11.

C. Indevuyst

L. Van Campen