

## Erweiterte Einsenderinformation zur Umstellung der Messung der freien Leichtketten

Die Bestimmung der freien Leichtketten ist ein essentieller Bestandteil bei der Diagnostik und der Verlaufskontrolle bei Plasmazellneoplasien. Eine Verschiebung des Verhältnisses von Kappa- zu Lambda-Leichtketten kann als Hinweis auf eine Klonalität und damit als Surrogatmarker für eine klonale Proliferation angesehen werden.

Der erste kommerziell erhältliche Test („Freelite®“) wurde Anfang der 2000er durch die Firma The Binding Site entwickelt<sup>i</sup>. Die erste Studie zu Referenzintervallen zu diesem Test wurde im Jahr 2002 publiziert<sup>ii</sup>. Hierfür wurde die Kombination aus Freelite®-Reagenzien und einem Nephelometer der Firma Siemens (BN II) verwendet. Diese Kombination aus Reagenzien und Analyzer wurde auch in einer ganzen Reihe von Studien verwendet, in denen die Bedeutung der Bestimmung der freien Leichtketten für das Screening<sup>iii</sup>, die Diagnose eines Multiplen Myeloms<sup>iv</sup>, die Remissionsbeurteilung<sup>v</sup> sowie für die Risikostratifizierung von Plasmazellneoplasien<sup>vi</sup> herausgearbeitet wurde. Diese Studien waren unter anderem die Grundlage für die Empfehlungen der International Myeloma Working Group (IMWG) zum Einsatz der Bestimmung der freien Leichtketten bei Plasmazellneoplasien aus dem Jahr 2008<sup>vii</sup>. Die Bestimmung der freien Leichtketten mit den Freelite®-Reagenzien wird daher oft als Goldstandard angesehen.

In den vergangenen Jahren wurde der Freelite®-Assay neben dem Siemens BN II auch auf einer ganzen Reihe von nephelometrischen oder turbidimetrischen Analysesystemen etabliert. Hierbei zeigte sich, mit Ausnahme eines einzigen Analysensystems (Beckman Immage) bei allen Geräten eine Verschiebung der Wertelage, die häufig auch zu einer veränderten (falschen) klinischen Klassifikation führte<sup>viii, ix, x, xi</sup>. Neben diesen „Analyzer-Effekten“ scheint es bei den Freelite®-Reagenzien in den Jahrzehnten seit der Einführung zu einem Drift zu höheren Werten gekommen zu sein<sup>xii, xiii, xiv, xv, xvi, xvii, xviii</sup>.

Nach der Einführung der neuen europäischen Verordnung zu in-vitro-Diagnostika und der Abkündigung der Unterstützung des Siemens BN II durch den Hersteller steht zu Messung des Freelite®-Assays nunmehr nur noch eine Plattform (Optilite von The Binding Site) zur Verfügung. Wie bereits beschrieben, kommt es hier zu einer Veränderung der Wertelage, ohne dass der Hersteller bislang seine Empfehlung zu den Referenzintervallen angepasst hat. Valide Referenzintervalle für diese Kombination aus Assay und Analyzer liegen derzeit also nicht vor.

Wir haben uns deshalb intensiv mit möglichen Alternativen beschäftigt und haben die folgenden Methoden evaluiert:

Der N-Latex der Firma Siemens in Kombination mit Siemens BN ProSpec oder Atellica Neph 630 ist ein latexverstärkter nephelometrischer Test, der auf einer Kombination aus monoklonalen Antikörpern zur Detektion der freien Leichtketten basiert<sup>xix</sup>. Dieser Test bietet gegenüber dem Freelite®-Test einige Vorteile (bessere Chargenstabilität, hohe Bindungsaffinität, bessere Präzision). Es kommt zu einer Verschiebung der Wertelage, jedoch zeigen die Assays eine gute Korrelation und auch eine befriedigende Konkordanz der klinischen Aussage<sup>xx</sup>. Die größten Nachteile sind die weiterhin nicht vollständige Detektion eines Antigenüberschusses sowie das Risiko einer fehlenden Antigenerkennung durch eingeschränkte Epitopspezifität der im Assay verwendeten monoklonalen Antikörper.

Der ELISA der Firma Sebia basiert im Gegensatz zum N-Latex-Test auf polyklonalen Antisera gegen Kappa- und Lambda-Leichtketten. Das ELISA-Format verhindert per se die bei nephelometrischen oder

turbidimetrischen Messverfahren inhärenten Probleme durch Antigenüberschuss oder durch Polymerisation der freien Leichtketten, die zu falsch-niedrigen bzw. falsch-hohen Ergebnissen führen<sup>xxi</sup>.<sup>xxii</sup>. Dementsprechend wurde in verschiedenen Vergleichsstudien gezeigt, dass der Freelite®- oder der N-Latex®-Assay bei hohen Konzentrationen die freien Leichtketten bis zu 10fach überschätzen<sup>xxiii</sup>.<sup>xxiv</sup>.<sup>xxv</sup>.

Dies führt jedoch nicht dazu, dass die Cutoffs der Ratio von involvierter zu nicht-involvierter Leichtkette zur Definition eines Multiplen Myelom ( $\geq 100$  bei  $\geq 100\text{mg/l}$  der involvierten Leichtkette) bzw. zur Definition eines Smoldering Multiplen Myeloms (SMM;  $\geq 20$ ) keine Gültigkeit mehr haben. In einer Studie an Serumproben aus der Originalkohorte, mit denen diese Cutoffs durch Messung mit dem Freelite®-Assay ermittelt wurden, konnte gezeigt werden, dass diese Cutoffs auch für den ELISA der Firma Sebia anwendbar sind und therapiebedürftige Patienten mit Multiplem Myelom und Hochrisikopatienten mit SMM zuverlässig mit der gleichen Spezifität identifiziert werden können.

Bei niedrigeren Konzentrationen freier Leichtketten zeigen die Werte im Vergleich zum Freelite®-Assay eine gute Korrelation und eine gute klinische Konkordanz. Dies konnten wir auch in unserer laborinternen Evaluation des Tests bestätigen.

Zusammengefasst lässt sich folgendes feststellen:

- 1) Durch die Abkündigung des Analyzers BN II ist eine Messung der freien Leichtketten mit der ursprünglich beschriebenen Kombination aus Reagenz und Gerät zukünftig nicht mehr möglich
- 2) Die Verwendung des gleichen Assays (Freelite®) auf einer anderen Plattform ist möglich, dafür existieren wegen des Assays-Drifts und der geräteabhängigen Wertelage keine validen Referenzintervalle
- 3) Der ELISA der Firma Sebia ist in allen relevanten Belangen mit dem Freelite®-Assay vergleichbar (Sensitivität, klinische Entscheidungsgrenzen, bekanntes Ausmaß der Verschiebung der Ratio bei CKD)
- 4) Hinsichtlich analytischer Interferenzen ist dieser Test allen anderen Verfahren zur Bestimmung der freien Leichtketten überlegen

Wir haben uns daher entschlossen, die bisherige Bestimmung der freien Leichtketten durch Freelite®/BN II durch den ELISA der Firma Sebia zu ersetzen.

---

<sup>i</sup> 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(4):673-680.

<sup>ii</sup> Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, Kyle RA. 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 Sep;48(9):1437-44

<sup>iii</sup> Katzmann JA, Kyle RA, Benson J, et al. Screening panels for detection of monoclonal gammopathies. *Clin Chem*. 2009;55(8):1517-1522.

<sup>iv</sup> Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International myeloma working group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014;15(12):e538-e548.

<sup>v</sup> Kapoor P, Kumar SK, Dispenzieri A, et al. Importance of achieving stringent complete response after autologous stem-cell transplantation in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2013;31(36):4529-4535.

<sup>vi</sup> Mateos MV, Kumar S, Dimopoulos MA, et al. International myeloma working group risk stratification model for smoldering multiple myeloma (SMM). *J Blood Cancer J*. 2020;10(10):102

<sup>vii</sup> Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, Palumbo A, Jagannath S, Blade J, Lonial S, Dimopoulos M, Comenzo R, Einsele H, Barlogie B, Anderson K, Gertz M, Harousseau JL, Attal M, Tosi P, Sonneveld P, Boccadoro M, Morgan G, Richardson P, Sezer O, Mateos MV, Cavo M, Joshua D, Turesson I, Chen W, Shimizu K, Powles R, Rajkumar SV, Durie BG; International Myeloma Working Group. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. 2009 Feb;23(2):215-24.

<sup>viii</sup> Cotten SW, Shajani-Yi Z, Cervinski MA, Voorhees T, Tuchman SA, Korpi-Steiner N. Reference intervals and diagnostic ranges for serum free  $\kappa$  and free  $\lambda$  immunoglobulin light chains vary by instrument platform: Implications for classification of patient results in a multi-center study. *Clin Biochem*. 2018 Aug;58:100-107.

<sup>ix</sup> Morales-García LJ, Pacheco-Delgado MS. Serum free light chain reference intervals in an Optilite and their influence on clinical guidelines. *Clin Biochem*. 2021 Jun;92:54-60.

- 
- <sup>x</sup> Rocamonde L, Hermida FJ. Serum Free Light Chain Reference Intervals in a Local Population in Spain using the Optilite Analyser. *Clin Lab*. 2023 Jan 1;69(1).
- <sup>xi</sup> Borai A, Ichihara K, Tamimi W, Masaud A, Sobki S. Establishment of reference intervals for free light chains and immunoglobulins in Saudi population. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2024;62(3): 522-529.
- <sup>xii</sup> Bossuyt X, Poesen K, Sprangers B, Reynders M, Vercammen M, Delforge M. Determination of free light chains: assay-dependent differences in interpretation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2021 Feb 23;59(2):e69-71.
- <sup>xiii</sup> Treger RS, Mathias PC, Cowan AJ, Green D, Hutchinson K, Bryan A, Chaudhary A, Fink SL, Wener MH, Morishima C. Data analytics improves the diagnostic accuracy of serum free light chain results for detecting monoclonal gammopathy. *American Journal of Clinical Pathology*. 2024 Mar 1;161(3):216-31.
- <sup>xiv</sup> Rindlisbacher B, Schild C, Egger F, Bacher VU, Pabst T, Leichtle A, Andres M, Sédille-Mostafaie N. Serum Free Light Chain Assay: Shift Toward a Higher  $\kappa/\lambda$  Ratio. *J Appl Lab Med*. 2020 Jan 1;5(1):114-125.
- <sup>xv</sup> Murray D, Dispenzieri A, Kumar S, Gill H, Vachon C, Snyder M, Willrich M. Free Light Chain Assay Drift: Potential for Misdiagnosis? *J Appl Lab Med*. 2020 Nov 1;5(6):1411-1413.
- <sup>xvi</sup> Minnema, M.C., Jacobs, J.F.M. In response to: Defining new reference intervals for serum free light chains in individuals with chronic kidney disease: results of the iStopMM study. *Blood Cancer J*. 12, 152 (2022).
- <sup>xvii</sup> Azimi V, Fiala MA, Zaydman MA. Use of the Current Standard of Practice Serum Free Light Chains (sFLC) Reference Interval Puts Black Patients at 5 Times Higher Odds for Light Chain Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (LC-MGUS). *Clinical chemistry*. 2023 Sep;69(9):1084-6.
- <sup>xviii</sup> Li B, King R, Chan B, Rollo C, Thompson S, Florkowski C. An updated diagnostic range for serum free light chain kappa/lambda ratio using Freelite reagents on BN II or Optilite. *Pathology*. 2024 Apr 9:S0031-3025(24)00098-9.
- <sup>xix</sup> Velthuis H, Knop I, Stam P, van den Broek M, Bos H, Hol S, Teunissen E, Fishedick K, Althaus H, Schmidt B, Wagner C, Melsert R. N Latex FLC – new monoclonal high-performance assays for the determination of free light chain kappa and lambda. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, vol. 49, no. 8, 2011, pp. 1323-1332.
- <sup>xx</sup> Hoedemakers RMJ, Pruijt JFM, Hol S, Teunissen E, Martens H, Stam P, Melsert R, te Velthuis H. Clinical comparison of new monoclonal antibody-based nephelometric assays for free light chain kappa and lambda to polyclonal antibody-based assays and immunofixation electrophoresis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 50, no. 3, 2012, pp. 489-495.
- <sup>xxi</sup> Jacobs JFM, de Kat Angelino CM, Brouwers HMLM, Croockewit SA, Joosten I, van der Molen RG. Evaluation of a new free light chain ELISA assay: bringing coherence with electrophoretic methods. *Clin Chem Lab Med*. 2018;56(2):312-322.
- <sup>xxii</sup> Pekar JD, Schraen S, Grzych G, Manier S, Onraed B. Antigen excess pitfall for free light chains measurements solved by ELISA assay. *Am J Hematol*. 2019;94(5):E120-E122.
- <sup>xxiii</sup> van Helden J, Evliyaoglu O, Dreßen D, Weiskirchen R. A new free light chain immunoassay shows advantages in the classification and in the follow-up of patients with paraproteinemia compared to a nephelometric assay. *Hematol Med Oncol* 2019; 4.
- <sup>xxiv</sup> Caponi L, Romiti N, Koni E, Fiore AD, Paolicchi A, Franzini M. Inter-assay variability in automated serum free light chain assays and their use in the clinical laboratory. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2020;57(2):73-85.
- <sup>xxv</sup> Fleming CKA, Swarttouw T, de Kat Angelino CM, Jacobs JFM, Russcher H. Method comparison of four clinically available assays for serum free light chain analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2019;58(1):85-94.