

Uit de laboratoriumpraktijk

Foutief verhoogd bilirubine bij een patiënt met multipel myeloom: M-proteïne interferentie

D.S. BOSS¹, C.M. HACKENG¹, H.R. KOENE², A. BIKKER³ en D. van LOON¹

Interferentie van M-proteïnen op geautomatiseerde chemie bepalingen is een veel voorkomend probleem. In dit artikel beschrijven wij een patiënt met multipel myeloom bij wie een onverklaarbaar hoge totaal bilirubine concentratie gemeten werd. Nadere analyse suggereert dat een reactie tussen immunoglobulinen van de patiënt en een component in het reagens van de totaal bilirubine assay hieraan ten grondslag ligt. Rapportage van foutieve laboratorium uitslagen kunnen klinici op het verkeerde been zetten. Wanneer een onverklaarbaar hoog totaal bilirubine gevonden wordt bij patiënten met monoclonale gammopathie dient interferentie te worden overwogen. Herhaling van de analyse op een ander platform kan in zulke gevallen uitkomst bieden.

Trefwoorden: hyperbilirubinemie, monoclonale gammopathie, interferentie, spectrofotometrie

Dat monoclonale immunoglobulinen kunnen interfereren met geautomatiseerde metingen op chemie analyzers is bekend. Dit is onder meer aangetoond voor frequent aangevraagde bepalingen als totaal eiwit (1), creatinine (2), ureum (3), fosfaat (4), glucose (5), ijzer (6), hemoglobine (7), CRP (8) en bilirubine (9,10,11). In de meeste gevallen leidt dit tot rapportage van foutief verhoogde uitslagen, wat een probleem kan vormen voor de aanvragers van het onderzoek.

In dit artikel beschrijven wij een patiënt met multipel myeloom waarbij een onverklaarbaar hoog totaal bilirubine gemeten werd. Gezien de afwezigheid van icterus en pathologie die deze uitslag zouden kunnen verklaren rees het vermoeden van een foutief verhoogde uitslag. Daarom zijn diverse experimenten uitgevoerd om de oorzaak van de foutieve meting te achterhalen, en het mechanisme te verklaren.

Casus

Een 68-jarige man werd door zijn huisarts doorverwezen naar ons ziekenhuis in verband met een verdenking op een multipel myeloom op basis van een sterk verhoogde bezinking (141 mm/uur). Zijn voorgeschiedenis vermeldt cataract waarvoor hij recentelijk (2012) elders

Afdeling Klinische Chemie¹ en Afdeling Interne Geneeskunde², st Antonius ziekenhuis Nieuwegein; Afdeling Klinische Chemie³, Meander medisch centrum, Amersfoort

E-mail: d.boss@antoniuziekenhuis.nl

geopereerd was, en een recente coronair angiografie (CAG), waarbij geen hartafwijkingen werden geconstateerd. Bij presentatie had de patiënt niet veel klachten behoudens enig gewichtsverlies. In het laboratorium zagen wij – naast sterke aanwijzingen voor het bestaan van een multipel myeloom – een totaal bilirubine van 640 µmol/l met een direct bilirubine van 1 µmol/l (gemeten op Roche Cobas 6000, 02/09/13). Tabel 1 toont een overzicht van de relevante laboratoriumuitslagen. Bij afwezigheid van icterus en klachten die het verhoogd totaal bilirubine konden verklaren werd gedacht aan de mogelijkheid van een foutief verhoogd totaal bilirubine, en is aanvullend onderzoek ingezet. In het eiwitspectrum vonden wij een IgG Lambda van 61,0 g/l. Na bevestiging van de diagnose multipel myeloom werd de patiënt behandeld met een combinatie van melfalan, prednison en bortezomib (12). Na de eerste kuur is wederom het totaal bilirubine bepaald (28/10/13, zie tabel 1). Deze was nu 7,3 µmol/l. Het IgG Lambda was gedaald naar 25,4 g/l.

Aanvullende laboratorium experimenten

Allereerst is er een plasma monster naar een ander laboratorium gestuurd, alwaar totaal bilirubine werd bepaald op andere chemie-analyzers. De gemeten waarden zijn uitgezet in tabel 2. Op de Abbott Architect werd een waarde gemeten van 5,4 µmol/l, op de Beckmann DxC van 5,0 µmol/l. In ons eigen laboratorium is de totaal bilirubine waarde gekwantificeerd na meting op de spectrofotometer (Beckman DU800, methode niet gevalideerd voor plasma) volgens het Duisersoft algoritme (13). Hieruit volgde een waarde van 4,0 µmol/l. Vervolgens is totaal bilirubine bepaald

Tabel 1. Relevante laboratorium uitslagen

Parameter	Eenheid	Ref.waarden	02/09/13	28/10/13
Bezinking	mm/uur	<7	>119	>119
Hemoglobine	mmol/l	7,8-10,2	6,7	6,6
Hematocriet	l/l	0,36-0,48	0,32	0,33
Erytrocyten	*10 ¹² /l	3,9-5,6	3,8	3,9
Trombocyten	*10 ⁹ /l	150-350	286	132
Leukocyten	*10 ⁹ /l	2,5-8,2	5,6	3,8
Bilirubine totaal	µmol/l	1-17	640	7,3
Bilirubine direct	µmol/l	1-5	2	3,1
Albumine	g/l	35-55	30,1	36,0
Totaal eiwit	g/l	60-80	118	83,3
Eiwitspectrum				
IgG Lambda	g/l		61,0	25,4

Tabel 2. Resultaten aanvullende bilirubine ($\mu\text{mol/l}$) bepalingen

Platform	Referentiewaarden	02/09/13
Roche Cobas 6000	1-17	640
1:2	1-17	191 ¹
1:4	1-17	2 ¹
1:8	1-17	0 ¹
Na PEG precipitatie ²	1-17	1,2-1,6 ¹
Abbott Architect	3,4-20,5	5,4
Beckmann DxC	5,1-20,5	5,0
Beckmann DU800 ³	-	4,0

¹: Waarden verkregen door het resultaat te vermenigvuldigen met de verdunningsfactor

²: Sample in duplo gemeten

³: Methode niet gevalideerd voor meting in plasma. Geen referentiewaarden bekend.

op de Roche Cobas analyzer in een monster na eiwit precipitatie (middels een PEG-precipitatie; plasma sample 1:2 verdunnen met polyethylene glycol 6000 25%, mengen, afdraaien en het supernatant aanbieden aan de analyzer), en in verdunde samples (verduningen van 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 en 1:64; in fysiologisch zout). De gemeten waarden van deze experimenten staan ook uitgezet in tabel 2. De reagentia die in de Roche Cobas totaal bilirubine assay worden gebruikt zijn samengevoegd met plasma van een patiënt met een hoog totaal bilirubine (340 $\mu\text{mol/l}$), evenals met het plasma van de patiënt die hier beschreven wordt, in de verhoudingen zoals gebruikt in de assay (zie tabel 3) voor de verhoudingen tussen reagentia en plasma). De kleurverschuiving die optrad na samenvoegen met plasma van de positieve controle patiënt was afwezig na samenvoegen met het plasma van onze casus patiënt. Wel zagen we na samenvoegen met plasma van onze casus patiënt een vertroebeling van het reactiemengsel optreden (figuur 1). Op de spectrofotometer zijn kinetische metingen uitgevoerd waarbij gemeten is op dezelfde golflengte als bij de Roche Cobas totaal bilirubine meting. Na samenvoeging van de Cobas reagentia en plasma van de positieve controle patiënt werd een snelle stijging gezien in absorptie bij een golflengte van 546 nm. Na samenvoeging van de Cobas reagentia en plasma van de casus patiënt werd een vertraagde toename in absorptie, met een uiteindelijk veel sterker absorptiemaximum geconstateerd (figuur 2).

Beschouwing

In dit artikel beschrijven wij een patiënt met een onverklaarbaar sterk verhoogd totaal bilirubine, gemeten op de Roche Cobas 6000 chemie analyzer. De patiënt was niet icterisch en had geen aanwijzingen voor leverpathologie. Metingen op andere chemie analyzers die uitgaan van hetzelfde bepalingprincipe gaven normale waarden, evenals spectrofotometrische kwantificering. Zowel de Roche assay als die van Abbot en Beckman is gebaseerd op de diazo methode, waarbij totaal bilirubine in een sterk zure omgeving wordt gekoppeld aan een diazonium ion (14). Het gevormde azobilirubine geeft een verkleuring die fotometrisch kan worden gemeten. De intensiteit van deze verkleuring is recht evenredig met de totaal bilirubine concentratie in het plasmamonster. De spectrofotometrische bepaling

die wij in ons laboratorium uitvoerden is gebaseerd op de lichtabsorptie van bilirubine in het gebied rond 455 nm. Ook met deze methode, die uitgevoerd wordt zonder gebruik van reagentia, vonden wij een lage bilirubine waarde. Tezamen genomen concluderen wij dat hier sprake is van een foutief verhoogde bilirubine meting op het Roche Cobas platform.

Eerder beschreven Pantanowitz et al. twee vergelijkbare casus (9). Deze betroffen een patiënte met Waldenström macroglobulinemie, bij wie een totaal bilirubine werd gemeten van maximaal 83,8 $\mu\text{mol/l}$ en een patiënt met een multipel myeloom met een gemeten bilirubine waarde van maximaal 345 $\mu\text{mol/l}$. In beide gevallen was er sprake van een monoclonale gammopathie die vermoedelijk ten grondslag ligt aan dit fenomeen. Dat dit een zeldzaam fenomeen is bleek uit hetzelfde artikel van Pantanowitz et al: In geen van 100 patiënten met een monoclonale gammopathie (IgG, IgA of IgM) werden afwijkende bilirubine waarden gerapporteerd. Later hebben andere groepen bevestigd dat M-proteïnen tot foutief verhoogde bilirubine resultaten kunnen leiden (10, 11). De bijsluiters van de Roche Cobas assay vermeldt vals verhoogde resultaten bij patiënten met Waldenström macroglobulinemie of multipel myeloom (15); de reden hiervan wordt niet beschreven. De gemeten bilirubine van de index casus is vergeleken met de eerder gepubliceerde artikelen een stuk hoger.

In het artikel van Pantanowitz et al. wordt de suggestie gewekt dat het oplosmiddel in Reagens 1 (R1) verantwoordelijk is voor de neerslagreactie. Dit baseren zij op het gegeven dat de interferentie niet optrad in de directe bilirubine assay, waar oplosmiddel R1 ontbreekt. Wij zagen dat de vertroebeling alleen optrad na sequentieel toevoegen van beide reagentia (R1 én R2). Na toevoeging van alleen R1 dan wel alleen R2 trad geen vertroebeling op en zagen wij een laag signaal op de spectrofotometer (data niet geïncludeerd). Dit suggereert dat beide reagentia nodig zijn om de neerslagreactie te laten verlopen. Een mogelijkheid is dat er een pH afhankelijke neerslagreactie plaatsvindt (R2 verlaagt de pH tot 1-2) tussen het oplosmiddel in R1 en een component in het plasma van de patiënt. De component in het plasma van de beschreven patiënten is naar alle waarschijnlijkheid een hoge concentratie immunoglobulinen. Voor aanvang van

Tabel 3. Informatie Roche Cobas 6000 totaal bilirubine assay

Principe	Diazo methode: Bilirubine + Diazonium ion → azobilirubin
Assay Type	2 punts eindpunt reactie
Reactietijd	10 minuten
Golflengte	600 nm (secundair) / 546 nm (primair)
Reagentia	
R1	Sulfamide zuur (H ₃ NO ₃): 110 mmol/l Natrium acetaat buffer (C ₂ H ₃ NaO ₂): 82 mmol/l Surfactant Oplosmiddel
R2	Diazonium ion: 3 mmol/l HCl: 100 mmol/l
Pipetteverhouding	R1 120 μl , R2 31 μl , plasma 2 μl

behandeling zagen wij in het eiwitspectrum een IgG Lambda van 61,0 g/l. Zowel na deproteïnering als na verdunnen zagen wij het totaal bilirubine sterk afnemen, hetgeen deze hypothese ondersteunt. Het feit dat de interferentie verdween na de eerste behandelkuur (de IgG Lambda was gedaald tot 25,4 g/l) is een andere sterke aanwijzing dat de immunoglobulinen de interfererende factor zijn. Dit is de eerste keer dat wordt beschreven dat na succesvolle behandeling de interferentie verdwijnt.

Wanneer een onverklaarbaar hoog totaal bilirubine wordt gevonden bij patiënten met monoclonale gammopathie dient interferentie zoals beschreven in dit artikel te worden overwogen. Het is dan raadzaam om de analyse opnieuw uit te voeren, indien mogelijk op nieuw materiaal. Wanneer bij herhaling onverklaarbaar afwijkende resultaten worden gevonden kan meting op een ander platform uitkomst bieden.

Referenties

1. Tichy M, Friedecky B, Budina M, Maisnar V, Buchler T, Holeckova M, Gotzmannova D, et al. Interference of IgM-lambda paraprotein with biuret-type assay for total serum protein quantification. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(2):235-6.
2. Nanda SK, Sarangi R, Ray L, Kumar A, Padhi S. Factitious biochemical reports which are caused due to paraproteinemia in multiple myeloma – a case report. *J Clin Diagn Res.* 2013;7(2):350-2.
3. Oudart JB, Ok V, Faucon C, Zucchini L, Chiron A, Maquart FX, Ramont L. Interference of M-paraprotein in automated urea assays. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(7):e153-5.
4. Barutcuoglu B, Parildar Z, Mutaf I, Habif S, Bayindir O. Spuriously elevated inorganic phosphate level in a multiple myeloma patient. *Clin Lab Haematol.* 2003;25(4):271-4.
5. Berth M, Delanghe J. Protein precipitation as a possible important pitfall in the clinical chemistry analysis of blood samples containing monoclonal immunoglobulins: 2 case reports and a review of the literature. *Acta Clin Belg.* 2004;59(5):263-73.
6. Bakker AJ. Influence of monoclonal immunoglobulins in direct determinations of iron in serum. *Clin Chem.* 1991;37(5):690-4.

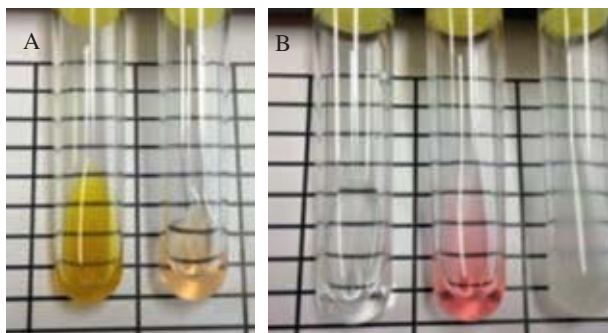
7. Goodrick MJ, Boon RJ, Bishop RJD, Copplestone JA, Prentice AG. Inaccurate haemoglobin estimation in Waldenström's macroglobulinemia: unusual reaction with monomeric IgM paraprotein. *J Clin Pathol.* 1993;46:1138-9.
8. Yu A, Pira U. False increase in serum C-reactive protein caused by monoclonal IgM-lambda: a case report. *Clin Chem Lab Med.* 2001;39(10):983-7.
9. Pantanowitz L, Horowitz GL, Upalakalin JN, Beckwith BA. Artifactual hyperbilirubinemia due to paraprotein interference. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127:55-59.
10. Yang Y, Howanitz PJ, Howanitz JH, Gorfajn H, Wong K. Paraproteins are a common cause of interferences with automated chemistry methods. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(2):217-23.
11. Smogorzewska A, Flood JG, Long WH, Dighe AS. Paraprotein interference in automated chemistry analyzers. *Clin Chem.* 2004;50(9):1691-3.
12. Zweegman S, Lokhorst HM, Levin M-D, de Waal E, Bos GMJ, Kersten MJ, Ypma P, et al. Richtlijnen behandeling multipel myeloom. *Ned Tijdschr Hematol* 2012;9(8):300-20.
13. Duiser HJ, Roelandse FWC, Lentjes EGWM, van Loon J, Souverijn JHM, Sturk A. Iterative model for the calculation of oxyhemoglobin, methemoglobin, and bilirubin in absorbance spectra of cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 2001;47(2):338-41.
14. Wahlefeld AW, Herz G, Bernt E. Modification of the Malloy-Evelyn method for a simple, reliable determination of total bilirubin in serum. *J Clin Lab Invest.* 1972;29 Supplement 126: Abstract 11.12.
15. Roche Cobas Total Bilirubin Special package insert.

Summary

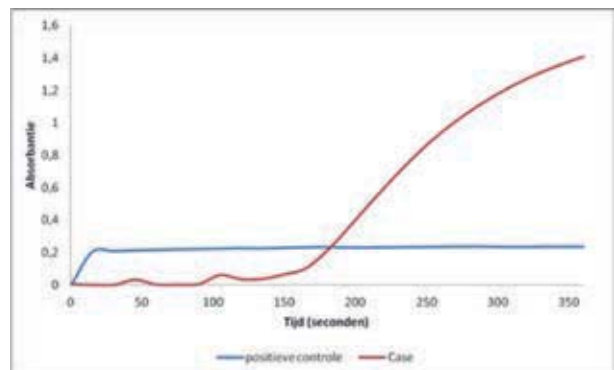
Boss DS, Hackeng C, Koene HR, Bikker A, van Loon D. False-elevated bilirubin in a patient with multiple myeloma: interference of M-protein. *Ned Tijdschr Klin Chem Lab Geneesk.* 2014;39:175-178

Analytical interference of M-proteins in the clinical laboratory is a well-known phenomenon. In this article we describe a multiple myeloma patient with an unexplained elevated total bilirubin. Further analyses suggest a reaction between the patient's immunoglobulins and a component in the total bilirubin assay reagents to be the cause of this phenomenon. Reporting of erroneous laboratory results to clinicians can have serious consequences. In situations where an unexplained high total bilirubin is found in patients with monoclonal gammopathy, interference should be considered. Repeating the measurement on another chemistry platform can be helpful in such cases.

Keywords: hyperbilirubinemia, monoclonal gammopathy, interference, spectrophotometry



Figuur 1. A: Plasma monster van een controle patiënt met een totaal bilirubine van 340 $\mu\text{mol/l}$ (linker buisje), en van de patiënt die beschreven wordt in deze casus (rechterbuisje). B: Reactiemengsels voor en na toevoeging van plasma. Het linker buisje bevat alleen de reagentia voor de Roche Cobas totaal bilirubine bepaling. Het middelste buisje bevat Roche Cobas reagentia en plasma van een controle patiënt met een totaal bilirubine van 340 $\mu\text{mol/l}$. Het rechterbuisje bevat Roche Cobas reagentia en plasma van de patiënt van deze casus.



Figuur 2. Spectrofotometrische metingen bij 546 nm in verloop van tijd na toevoeging van plasma van een patiënt met een hoog bilirubine (blauwe lijn) en plasma van de patiënt uit deze casus (rode lijn) aan Roche Cobas reagentia R1 + R2.