

Detectie en kwantificering van M-proteïnes: vergelijk van verschillende elektroforetische procedures

A.J. BAKKER¹, C. ELDERMAN-van der WERF, T. van ABBEMA, J.H. van der BIJ, J. HOEKSTRA en L. KUPPENS

Onderzoek naar de aan- of afwezigheid van een M-proteïne wordt soms bemoeilijkt doordat de monoklonale band in het eiwitspectrum niet te scheiden is van één van de reguliere banden in het eiwitspectrum. De detectie wordt met name verstoord bij lagere concentraties M-proteïne en bij lichte keten M-proteinemie. De CBO-richtlijn (1) geeft daarom aan om bij een negatief resultaat van het eiwitspectrum een immunofixatie uit te voeren met een pentavalent antiserum. Ook de kwantificering van de monoklonale eiwitten is door het (gedeeltelijk) samenvallen met één van de reguliere banden van het eiwitspectrum lastig, waardoor een betrouwbare uitgangswaarde ontbreekt. Omdat verschillende soorten gel voor agarose-elektroforese gebruikt kunnen worden, is in deze studie onderzocht of het soort agarosegel verschil maakt voor enerzijds de detectie en anderzijds voor de kwantificering van monoklonale banden.

Methoden

Van patiënten met de aanvraag 'eiwitspectrum' werd het serum op het moment van binnenkomst gesplitst. Eén deel werd gebruikt voor de routine analyse en een tweede deel werd ingevroren bij -30 °C. Na de routineanalyse werden de monsters van de patiënten met een M-proteïne geselecteerd voor nadere analyse. Op deze manier werden van 466 patiënten monsters geselecteerd voor deze studie. De patiëntenmonsters werden vlak voor analyse ontdooid; alle elektroforeses werden op dezelfde dag kort na elkaar uitgevoerd. Tevens werden 105 monsters zonder aantoonbaar M-proteïne geselecteerd voor analyse ten behoeve van een vergelijk van de eiwitfracties tussen de verschillende methoden. Routinematig werd de eiwitelektroforese uitgevoerd met de SAS-3-SP-60SB kit (Helena, art. no.: 300200) op de SPIFE 2000 (Helena Biosciences, Sysmex Nederland BV, Eetten-Leur). Immunofixatie werd uitgevoerd met de SPIFE 2000 met de SAS-IFE-9 kit (Helena, art. no.: 300300 en 300301) voor de specifieke immunofixaties. Deze combinatie van eiwitelektroforese en immunofixatie werd als 'gouden standaard' voor dit onderzoek beschouwd (verder aangeduid als H6). Ten behoeve van dit onderzoek werd de eiwitelektroforese uitgevoerd met de Hydrasys 2 van Sebia (Sebia Benelux s.a., Brussel, België). Voor dit onderzoek werd bij de eiwitelektro-

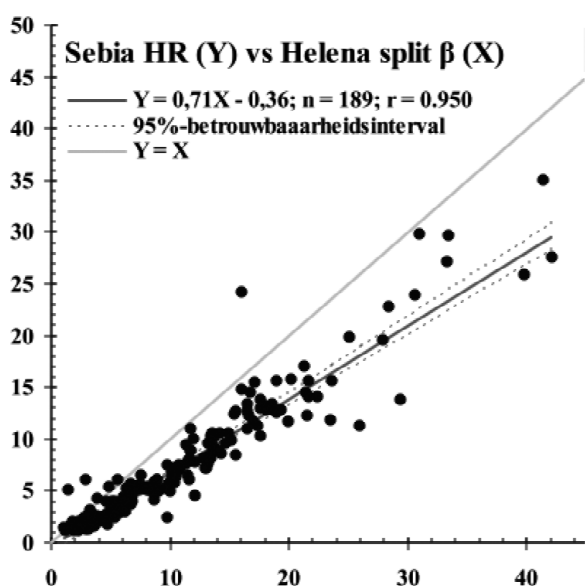
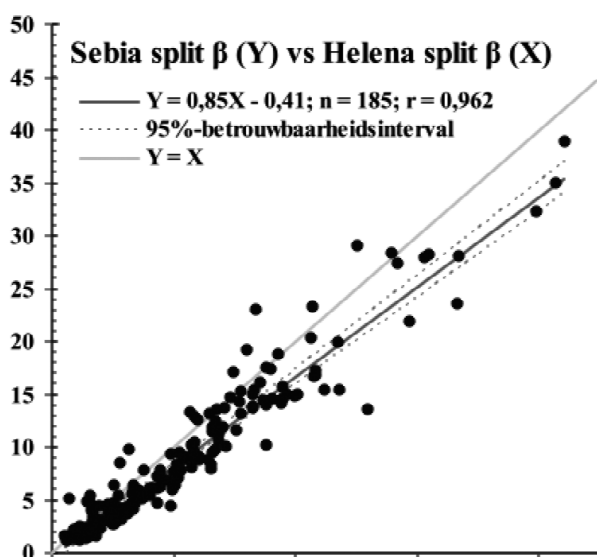
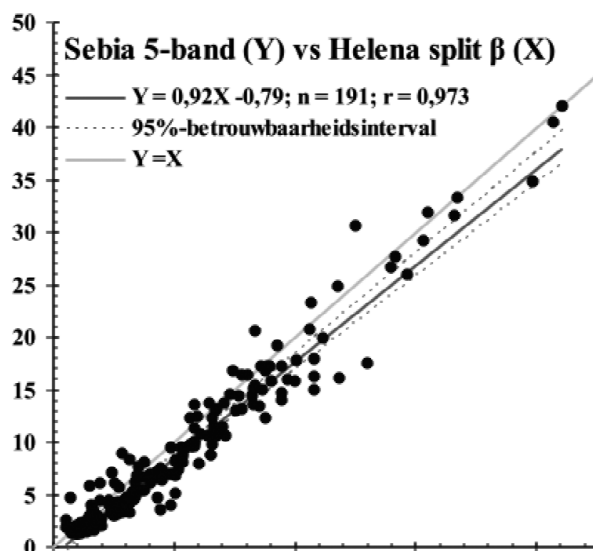
foreses gebruikt gemaakt van de Hydragel 30 proteïne kit (Sebia, art. no.: 4140; S5, 5-banden patroon), de Hydragel β 1- β 2 (Sebia, art. no.: 4141; S6, split- β patroon) en de Hydragel HR (Sebia, art. no.: 4122; SHR, hoge resolutie eiwitelektroforese). Alle elektroforeses werden uitgevoerd conform de instructies van de leverancier. Voor detectie van een M-proteïne werden de gels visueel geïnspecteerd. Voor de kwantificering en de mogelijkheid tot afgrenzen van de reguliere banden werd gebruik gemaakt van de Phoresis software van Sebia, na inscannen van het eiwitpatroon. Standaard werd gecorrigeerd voor de achtergrond; soms werd deze correctie niet uitgevoerd om zo toch een scheiding met een reguliere eiwitband mogelijk te maken. Voor de regressieanalyse werd gebruik gemaakt van de methode van Passing-Bablok met de Analyse-It software voor Excel 2003.

Resultaten

Voor de niet-M-proteïne monsters (n = 106) is de overeenstemming tussen de eiwitfracties van de verschillende agarosegels weergegeven in tabel 1. In het algemeen is de overeenstemming van de 5-bands gel en de split- β gel goed, waarbij de β -band van de split- β gel in het algemeen wat hoger is dan die van de 5-bands gel. De HR gel geeft in de vergelijking met de beide andere gels bij alle fracties meer spreiding, terwijl de beide α -banden met de HR gel structureel hogere resultaten geven. De patiëntengroep (n = 466) bleek na analyse te bestaan uit: 441 patiënten met een M-proteïne, waarvan 99 eerder niet als zodanig bekend waren, 11 patiënten waarbij het M-proteïne niet meer aantoonbaar was en 10 patiënten met oligoklonale banden, terwijl bij 4 patiënten geen afwijkingen werden gevonden (monsterwisseling bij selectie?). Bij de interpretatie van de eiwitpatronen van de M-proteïne monsters werden geen afwijkingen gevonden bij 25/90/82/129 van de sera voor respectievelijk de H6/S5/S6/SHR procedure. Een M-proteïne werd gevonden bij 441/376/384/337 van de monsters, waarbij het M-proteïne kwantificeerbaar ($\geq 1,0$ g/l) was bij 215/221/192/209 van de monsters. Het M-proteïne was niet te scheiden van één van de reguliere eiwitbanden in 77/41/81/44 van de gevallen. Van de monsters met een meetbaar M-proteïne werden de concentraties van het M-proteïne ($>1,0$ g/l) van de verschillende gelsystemen onderling vergeleken; deze resultaten staan ook vermeld in tabel 1. Een vergelijking van de resultaten ten opzichte van de routinemethode wordt in de figuur 1 getoond.

St. Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

E-mail: a.j.bakker@kcl.znb.nl



Figuur 1. Vergelijking van de concentraties M-proteïne uit het eiwitspectrum (in g/l) verkregen via de Hydrasys proteïne (5-band), split β en HR (hoge resolutie) procedure met de routine Helena split β procedure.

Conclusies

Detectie van een M-proteïne in de eiwit-elektroforese wordt soms bemoeilijkt doordat de monoklonale band samenvalt met één van de reguliere eiwitbanden. De mate waarin dit optreedt verschilt met de gebruikte agarosegel zoals uit ons onderzoek blijkt. Uit de resultaten blijkt dat de detectie van het M-proteïne beter lukt met een betere elektroforetische resolutie zoals het geval is bij de Hydragel $\beta 1$ - $\beta 2$. Het gebruik van een hoge resolutie gel geeft een minder goede detectie van het M-proteïne, waarschijnlijk omdat kleine bandjes minder goed te herkennen zijn. Hoewel in dit verband niet valt uit te sluiten dat er een zekere mate van selectie-

Tabel 1. Statistische analyse van de resultaten verkregen in monsters zonder M-proteïne met 5-bandsagarose elektroforese van Sebia (S5), de split- β agarose elektroforese van Sebia (S6) en de hoge resolutie agaroseelektroforese van Sebia (SHR). Tevens staan de resultaten vermeld van de vergelijking van de kwantitatieve M-proteïne-waarden verkregen met de verschillende methodes.

| Regressielijn | Aantal | R ² | Bias |
|---|--------|----------------|-------|
| Albumine _{S6} = 1,01 x Albumine _{S5} - 0,57 | 106 | 0,98 | -0,29 |
| Alfa-1 _{S6} = 0,91 x Alfa-1 _{S5} + 0,03 | 106 | 0,94 | -0,16 |
| Alfa-2 _{S6} = 0,96 x Alfa-2 _{S5} - 0,38 | 106 | 0,86 | -0,38 |
| Beta _{S6} = 1,12 x Beta _{S5} + 0,08 | 106 | 0,87 | 1,12 |
| Gamma _{S6} = 1,03 x Gamma _{S5} - 0,44 | 106 | 0,94 | -0,30 |
| M-eiwit _{S6} = 0,95 x M-eiwit _{S5} + 0,12 | 183 | 0,98 | -0,36 |
| Albumine _{SHR} = 1,05 x Albumine _{S5} - 4,57 | 106 | 0,90 | -2,23 |
| Alfa-1 _{SHR} = 1,27 x Alfa-1 _{S5} + 0,44 | 102 | 0,47 | 1,14 |
| Alfa-2 _{SHR} = 1,01 x Alfa-2 _{S5} + 0,98 | 106 | 0,78 | 0,91 |
| Beta _{SHR} = 1,15 x Beta _{S5} - 0,59 | 106 | 0,64 | 0,45 |
| Gamma _{SHR} = 1,08 x Gamma _{S5} - 0,85 | 100 | 0,77 | -0,20 |
| M-eiwit _{SHR} = 0,790 x M-eiwit _{S5} + 0,08 | 104 | 0,93 | -1,88 |
| Albumine _{SHR} = 1,02 x Albumine _{S6} - 3,40 | 106 | 0,92 | -2,00 |
| Alfa-1 _{SHR} = 1,41 x Alfa-1 _{S6} + 0,32 | 102 | 0,44 | 1,30 |
| Alfa-2 _{SHR} = 1,04 x Alfa-2 _{S6} + 1,14 | 106 | 0,81 | 1,28 |
| Beta _{SHR} = 1,01 x Beta _{S6} - 0,59 | 106 | 0,66 | -0,68 |
| Gamma _{SHR} = 1,08 x Gamma _{S6} - 0,59 | 100 | 0,79 | 0,06 |
| M-eiwit _{SHR} = 0,82 x M-eiwit _{S6} + 0,13 | 183 | 0,91 | -1,57 |

bias is opgetreden door alleen monsters te selecteren met een M-proteïne op basis van de routineprocedure (Helena split- β procedure). Hierdoor zou de vergelijkbare Hydrasys β 1- β 2 procedure bevoordeeld kunnen zijn. Kwantificering van M-proteïnes is belangrijk als uitgangswaarde voor de behandeling. Voor follow-up is het van groot belang dat de monoklonale banden goed zijn te kwantificeren en van de reguliere banden zijn af te grenzen. In dit onderzoek blijken bij de Hydrigel β 1- β 2 de gevonden M-proteïnes frequenter samen te vallen met de β -banden, vooral met de β 2-band. Dientengevolge lukt het beter een M-proteïne te kwantificeren

met de Hydrigel proteïne en de Hydrigel HR. De concentraties van het M-proteïne gemeten van de Hydrigel HR zijn echter circa 20% lager dan die gemeten met de beide andere gels. Samengevat is een split- β procedure beter voor de detectie van M-proteïne, terwijl voor de kwantificering een 5-bands gel of eventueel een hoge resolutiegel de voorkeur verdient.

Referenties

1. Kwaliteitsinstituut voor de gezondheidszorg CBO. Monoklonale gammopathie (paraproteïnemie). Utrecht: CBO; 2001.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2011; 36: 230-232

Online publieksinformatie van de NVKC: volwassen, betrouwbaar en erkend

D.L. BAKKEREN en C. RUITER*

Sinds 2003 beantwoordt de NVKC-werkgroep Publieksvragen vragen van patiënten, hun familieleden en andere geïnteresseerden. Het doel van deze openbaar toegankelijke en gratis dienstverlening is om de patiënt beter toe te rusten in kwesties rond laboratoriumdiagnostiek. Indirect wordt hiermee meer bekendheid gegeven aan het vakgebied van de klinische chemie en wordt de klinische chemicus geprofileerd met zijn consultfunctie richting de patiënt. Bij de evaluatie van deze service in 2005 bleek er al een redelijk belangstelling voor te zijn, maar met gemiddeld 4 tot 6 vragen per week moet dit toch bescheiden genoemd worden.

In 2006 kreeg het RIVM van het ministerie van VWS de opdracht om burgers breed te informeren over alle zaken rondom de gezondheidszorg - van zorgverzekeringen tot en met ziektebeelden en diagnostiek - opdat zij in deze tot betere keuzes komen: www.kiesbeter.nl. De beschrijving van laboratoriumonderzoek op deze site was inhoudelijk onvolledig en zeer beperkt. Hierop heeft de Commissie PR en Communicatie het RIVM voorgesteld dat klinisch chemici een groot aantal testbeschrijvingen zouden maken. Uit de werkgroep Publieksvragen is daarop de werkgroep Kiesbeter voortgekomen. Ruim 30 klinisch chemici en artsen klinische chemie hebben een eerste set van de 200 meest voorkomende klinisch chemische testen beschreven. De grootste uitdaging daarbij was het zoeken naar de aansluiting bij het publiek: het RIVM stelt als eis dat teksten het VMBO-niveau niet mogen overstijgen. In periode september/oktober 2008 zijn deze testbeschrijvingen geplaatst op www.kiesbeter.nl en één op één

ook op de NVKC-Publiekswebsite www.uwbloedserius.nl. Bij elk van de testbeschrijvingen is vermeld dat de mogelijkheid bestaat om aanvullend een vraag te stellen aan een klinisch chemicus. Wij onderzochten het gebruik van de publiekswebsite. www.uwbloedserius.nl. De uitgebreide informatievoorziening via beide websites gecombineerd met de mogelijkheid om laagdrempelig een (publieks)vraag te stellen aan een klinisch chemicus heeft invloed gehad op het aantal en de aard van de Publieksvragen. De kwaliteit van de beantwoording van de Publieksvragen borgt de werkgroep via het leveren van 'peer comment'. Ook dit commentaar wordt binnen de volledige werkgroep gedeeld. Elke beantwoorde publieksvraag wordt ook naar elk werkgroep lid gemaild. Zij hebben de gelegenheid om via een soort Post-It commentaar te geven bij het gegeven antwoord; commentaar dat overigens ook weer naar alle deelnemers (maar uiteraard niet naar de vragensteller) wordt gestuurd. Uiteraard verloopt alles elektronisch via een applicatie van eigen ontwerp. Het eerder genoemde kwaliteitsinstrument bij de beantwoording van de Publieksvragen is het 'peer comment'. Met dit onderzoek willen we aantonen dat het breed beschikbaar maken van klinisch chemische informatie in combinatie met de mogelijkheid om direct een deskundige te raadplegen, voorziet in een behoefte.

Methoden

Sinds de start van de publieksvragenservice wordt statistiek van het aantal vragen en de onderwerpen bijgehouden. Sinds de start van www.uwbloedserius.nl in maart 2008 worden de bezoekersaantallen, o.a. op herkomst en zoekgedrag, gevolgd via Google Analytics. Google Analytics (GA) registreert de geografische herkomst van bezoekers van website op basis van het IP-adres van de internet-serviceprovider in combinatie

*namens de werkgroep Publieksvragen en de werkgroep UwBloedserius/Kiesbeter NVKC

E-mail: D.Bakkeren@mmc.nl