

Short Communications

Eiwitelektroforese: vergelijking agarosegelelektroforese met de V8 capillaire elektroforese

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

Onderzoek naar aan-/afwezigheid van een M-proteïne conform de CBO-richtlijn (1) is tijdrovend door een combinatie van de aard van de analysemethode en de opeenvolging van de uitvoering van eiwitspectrum en immunofixatie als de verwerking seriematig geschiedt. De hierbij veel gebruikte agarosegel eiwitelektroforese is tijdrovend omdat veel handwerk nodig is en omdat deze techniek seriematige verwerking met zich mee brengt. Capillaire eiwitelektroforese kan sneller resultaten opleveren omdat deze techniek onafhankelijk is van een vaste seriegrootte, werkt met positieve monsteridentificatie en de mogelijkheid biedt van reflex immunotypering. In deze studie is onderzocht of het screenend onderzoek voor het opsporen/uitsluiten van M-proteinemie via het eiwitspectrum met het V8 capillaire elektroforesesysteem van Helena (Helena Biosciences, Sysmex Nederland BV, Etten-Leur) een betrouwbaar alternatief is voor de agarosegeleiwitelektroforese.

Methoden

1010 Opeenvolgende patiënten, waarvoor onderzoek naar aan-/afwezigheid van een M-proteïne was aangevraagd, zijn geïnccludeerd. 242 Patiënten waren reeds bekend met een M-proteïne, terwijl 768 patiënten niet bekend waren. In de serummonsters van al deze patiënten is eiwitelektroforese op agarosegel uitgevoerd gevolgd door immunofixatie (conform de CBO richtlijn). Tevens zijn deze monsters onderworpen aan capillaire eiwitelektroforese. Agarose eiwitelektroforese met een split- β procedure werd uitgevoerd met de SAS-3-SP-60 SB kit (Helena, art. no.: 300200) op de SPIFE 2000 (Helena). Immunofixatie werd uitgevoerd met de SAS-3 urine analysis kit (Helena, art. no.: 300400 en 321300) voor de pentavalente immunofixatie en, indien daar aanleiding voor was, met de SAS-IFE-9 kit (Helena, art. no.: 300300 en 300301) voor de specifieke immunofixaties. Deze immunofixaties werden eveneens uitgevoerd met de SPIFE 2000. Capillaire eiwitelektroforese werd uitgevoerd met de V8 (Helena) met de bijbehorende SPZOOM kit (eveneens een split- β procedure). Alle analyses werden uitgevoerd conform de instructies van de leveranciers.

In het kader van dit onderzoek werd de uitkomst van het eiwitspectrum met de agarosegel elektroforese bij verdenking op een M-proteïne, dat wil zeggen bij aanwezigheid van een extra band, bij hypogammaglobulinemie (γ -gebied <6 g/l op basis van agarosegel elektroforese) en bij afwijkingen in het patroon van de beide β -banden, als positief beschouwd en werd een immunofixatie met specifieke antisera nodig geacht. In het geval van een normaal eiwitspectrum, bij een acute fase patroon, een hypergammaglobulinemie en bij β - γ bridging werd de uitkomst als negatief aangemerkt en werd een immunofixatie als onnodig beschouwd. In deze groep met een negatieve beoordeling van het eiwitspectrum werd conform de CBO-richtlijn de immunofixatie met het pentavalente antiserum, eventueel gevolgd door een immunofixatie met specifieke antisera, als 'gouden standaard' gebruikt. Op grond van het patroon in de capillaire elektroforese werd vervolgonderzoek nodig geacht, als er sprake was van verdenking op de aanwezigheid van monoklonale banden, verstoring van het bandenpatroon in het β - en γ -gebied en bij hypogammaglobulinemie (γ -gebied <6 g/l op basis van capillaire elektroforese).

Monoklonale banden, indien aanwezig, werden met beide technieken gekwantificeerd met de skimmed procedure. Correlatieanalyse werd uitgevoerd met de Analyse-It add-in voor Microsoft Excell-2003.

Resultaten

De resultaten van de dagelijkse controlemonsters staan vermeld in de tabel 1. Voor de overeenstemming tussen beide eiwitelektroforeses zijn de concentraties van de verschillende eiwitfracties met elkaar vergeleken van 332 monsters waarin op grond van beide technieken geen verdenking bestond op een M-proteïne. De correlatiegegevens van deze vergelijking tussen de fracties zijn in tabel 2 weergegeven. Van de 242 patiënten die bekend waren met een M-proteïne was het M-proteïne met agarosegelelektroforese / immunofixatie bij 6 niet meer aantoonbaar. Met capillaire elektroforese werd bij 128 patiënten het M-proteïne overduidelijk gevonden; bij 110 werd wel en bij 4 geen vervolgonderzoek nodig geacht. Tevens zijn voor die monsters waarin een meetbare concentratie van een M-proteïne aantoonbaar was (N=126), de gemeten concentraties van beide methoden vergeleken (zie figuur 1). De regressiegegevens staan ook in tabel 2 vermeld. M-proteïnes waarvan de concentratie niet te kwantificeren was

St. Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

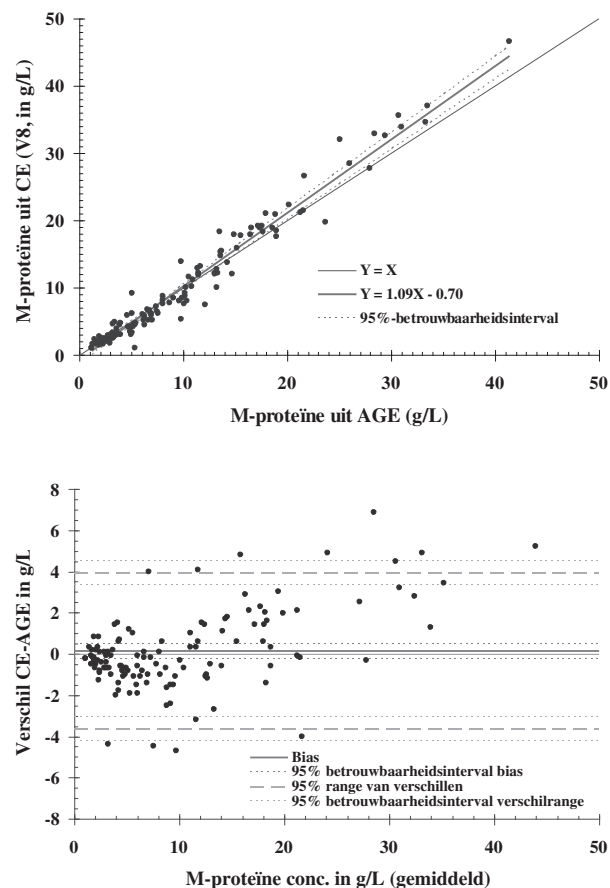
E-mail: a.j.bakker@kcl.znb.nl

wegens een te lage concentratie, dat wil zeggen <1,0 g/l (n=94), of waarvan de band niet te scheiden was van één van de normale (meest β -) banden bij agarosegel elektroforese (n=46) en/of capillaire elektroforese (n=60), zijn voor dit vergelijk uitgesloten.

Tenslotte werd de effectiviteit van de M-proteïne screening via de eiwitelektroforese met agarosegel elektroforese en capillaire elektroforese vergeleken in 768 patiënten die tevoren niet bekend waren met een M-proteïne. Op basis van agarosegelelektroforese/capillaire elektroforese werd bij 593/402 geen vervolgonderzoek nodig geacht. Bij 5/402 bleken in de agarosegelelektroforese wel monoclonale bandjes met een lage concentratie (<2 g/l) aanwezig. In het vervolgonderzoek bleek bij agarosegelelektroforese in 78/175 een M-proteïne aantoonbaar, terwijl dit na capillaire elektroforese bij 73/366 het geval was.

Conclusies

Capillaire eiwitelektroforese heeft uit logistiek oogpunt een aantal duidelijke voordelen. Omdat er geen sprake is van het volmaken van een eiwitplaat zoals bij agarosegel elektroforese, kan dagelijks de productie worden weggewerkt. Primaire buizen kunnen met positieve monsteridentificatie worden aangeboden, terwijl bij agarosegel elektroforese door het gebruik van secundaire buizen, het overbrengen van monstertray's naar de elektroforese module en het overbrengen van de geëlektroforeerde plaat naar de kleurmodule meer hands-on time nodig is. Bovendien kan bij capillaire elektroforese immunotypering via reflextesting onder dezelfde elektroforetische omstandigheden plaatsvinden zonder



Figuur 1. Vergelijking van de concentraties M-proteïne uit het eiwitspectrum verkregen via AGE en CE.

Tabel 1. Kwaliteitscontrole resultaten over 15 analysedagen en 8 capillairen ($N_{\text{tot}} = 120$; $N_{\text{indiv}} = 8$).

Fractie	QC ₁ gem.± SD	CV ₁ totaal	CV ₁ range indiv. capillair.	QC ₂ gem.± SD	CV ₂ totaal	CV ₂ range indiv. capillair.
Albumine	62,8 ± 0,70	1,1%	0,9 – 2,0%	57,3 ± 0,80	1,4%	1,0 – 2,0%
Alfa-1	4,35 ± 0,32	7,3%	3,8 – 9,5%	4,13 ± 0,52	12,7%	5,9 – 17,2%
Alfa-2	8,49 ± 0,33	3,9%	2,0 – 6,2%	7,43 ± 0,73	9,8%	7,4 – 14,0%
Beta-1	8,56 ± 0,44	5,2%	2,7 – 7,2%	5,93 ± 0,58	9,8%	7,9 – 12,4%
Beta-2	4,53 ± 0,26	5,8%	3,4 – 7,5%	2,63 ± 0,20	7,8%	6,4 – 10,4%
Gamma	11,2 ± 0,65	5,8%	3,0 – 9,3%	22,6 ± 0,65	2,9%	1,4 – 4,1%

Tabel 2. Correlatiegegevens (op basis van de Passing-Bablok methode) voor de vergelijking tussen de verschillende eiwitfracties gemeten in monsters zonder M-proteïne met agarose gelelektroforese (AGE) en capillaire eiwitelektroforese (V8). Tevens zijn vermeld de correlatiegegevens van de kwantificering van de M-proteïnes met beide methoden.

Fractie	Regressielijn (Passing-Bablok)	95%-Range helling	95%-Range asafsnede	N	R	Bias bias	95%-range
Albumine	V8= 1,11x AGE – 2,12	1,06 – 1,17	-4,27 – -0,05	332	0,90	2,25	2,05 – 2,44
Alfa-1	V8= 1,57x AGE + 0,74	1,37 – 1,82	0,19 – 1,19	332	0,46	1,97	1,89 – 2,05
Alfa-2	V8= 1,35x AGE – 3,50	1,24 – 1,48	-4,51 – -2,64	332	0,74	-1,07	-1,20 – -0,93
Beta-1	V8= 0,99x AGE – 1,33	0,89 – 1,11	-1,99 – -0,72	332	0,58	-1,41	-1,47 – -1,34
Beta-2	V8= 1,32x AGE – 1,79	1,21 – 1,44	-2,28 – -1,38	332	0,76	-0,55	-0,61 – -0,48
Gamma	V8= 0,84x AGE – 0,42	0,81 – 0,87	-0,81 – -0,04	332	0,92	-2,29	-2,39 – -2,18
M-proteïne	V8= 1,09x AGE – 0,70	1,04 – 1,13	-1,03 – -0,45	126	0,97	0,13	-0,21 – 0,47

dat een volle serie moet worden opgebouwd zoals bij agarosegel elektroforese. Dit betekent bij overduidelijke banden dat de immunotypering direct kan worden afgewerkt. Bij de beoordeling van capillaire eiwitpatronen wordt de aanwezigheid van monoklonale bandjes minder vaak herkend dan bij agarosegelelektroforese. Bij de agarosegelelektroforese zijn bij de 593 negatief beoordeelde eiwitspectra geen bandjes gemist; in voorgaande studies zijn slechts enkele bandjes gemist omdat deze met een lage concentratie M-proteïne onder een β -band vielen (2, 3). Met capillaire elektroforese blijken vaker kleine bandjes gemist te worden (3). Opvallend is in deze studie het grote aantal verdenkingen op een mogelijk M-proteïne met capillaire elektroforese, zeker wanneer dit wordt vergeleken met een vorige studie (3). Dit wordt vermoedelijk veroorzaakt door een aantal technische problemen met de V8 tijdens dit onderzoek, waardoor monsters na ontdooien te lang hebben gestaan. Het gevolg hiervan is dat complement ontleeft waardoor er extra bandjes in het β - γ gebied ontstaan die leiden tot een verdenking op een mogelijk M-proteïne.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2012; 37: 214-216

Nierinsufficiëntie na hart-chirurgie: heeft meten van NGAL zin?

A.J. BAKKER¹, L. de BOER¹, H.SYPERDA¹, M. KOOPMANS² en M.A KUIPER²

Vroegtijdige herkenning van patiënten die acuut nierfunctiestoornissen ontwikkelen is belangrijk omdat tijdige interventie de prognose kan verbeteren. De tot dusverre gebruikte biomerkers (zoals serum kreatinine) wordt niet alleen gekenmerkt door een zekere maat van imprecisie (Jaffé gebaseerde testen), maar ook door de vertraagde reactie (ze stijgen pas nadat nierfunctiestoornissen zijn opgetreden) zodat effectieve therapie niet tijdig ingesteld kan worden. Nadat in een muismodel is gebleken dat NGAL (Neutrofiel Gelatinase-Associated Lipocalin) één van de meest gereguleerde genen was in de vroege post-ischemische muizenier, wordt NGAL gezien als een veelbelovende parameter om vroegtijdig die patiënten te herkennen die at risk zijn voor de ontwikkeling van acute nierfunctiestoornissen (1). Tot voor kort viel het meten van NGAL buiten het bereik van de routinelaboratoria omdat voor de analyse ELISA technieken werden gebruikt. Deze laten zich niet gemakkelijk gebruiken in een routinesetting waar een dergelijke test 24 uur per dag 7 dagen in de week beschikbaar moet zijn. Met de komst van commerciële kits, die op routine ana-

Concluderend heeft bij de eerste screening gericht op het uitsluiten van M-proteïnemie de V8 capillaire elektroforese uit logistiek oogpunt de voorkeur, maar dit gaat ten koste van de sensitiviteit, met name monoklonale bandjes met geringe concentratie M-proteïne worden vaker gemist.

Referenties

1. Kwaliteitsinstituut voor de gezondheidszorg CBO. Monoklonale gammopathie (paraproteïnemie). Utrecht: CBO; 2001.
2. Bakker AJ, Bierman-Ram A, Elderman-van der Werf C, Strijdhartig ML, van Zanden JJ. Screening for M-proteinemia: Serum protein electrophoresis and free light chains compared. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47: 1507-1511.
3. Bakker AJ, Elderman-van der Werf C, Herrarti L, van Abbema T, Springer MA, McLaughlin PMJ, van Zanden JJ. Screening op M/proteïne vergelijking agarosegel/eiwit-elektroforese met capillaire eiwitelektroforese. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk.* 2010; 35: 168-170.

lyzers kunnen worden geadapteerd, is de meting van NGAL geschikt geworden voor de dagelijkse klinische praktijk.

In dit onderzoek is het mogelijke gebruik van NGAL onderzocht bij patiënten die een open hart operatie hadden ondergaan, met als doel die patiënten te selecteren die ten gevolge van de operatie een nierinsufficiëntie ontwikkelen (2). Omdat het door de leverancier aanbevolen EDTA plasma voor deze test om logistieke redenen minder gewenst is voor de routine chemie analyzer, is tevens de geschiktheid van heparine-plasma voor de meting van NGAL onderzocht.

Methoden

Voor dit onderzoek werd EDTA-plasma voor onderzoek op NGAL ingevroren van 192 opeenvolgende patiënten. Bloed werd afgenomen zodra de patiënten na de hartoperatie op de IC werden opgenomen. Tevens werd op de ochtend na de hartoperatie bloed afgenomen. Het uit dit EDTA-bloed bereide EDTA-plasma werd ingevroren bij -30°C tot analyse. Voor de beoordeling of zich nierfunctiestoornissen ontwikkelden werd kreatinine middels een Jaffé gebaseerde test geanalyseerd met de modular P analyzer (methode: rate-blanked, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Duitsland). Voor de vergelijking van EDTA-plasma en Heparineplasma is gelijktijdig afgenomen EDTA-

St. Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Leeuwarden en Intensive Care, Medisch Centrum Leeuwarden², Leeuwarden.

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