

## Evaluatie van een kwantitatieve bepalingmethode van Bence Jones eiwitten in urine

E.M. van BEEK<sup>1</sup>, A.A.M. VERHEUL<sup>1</sup>, A.J. van HOUTE<sup>1,2</sup> en W. KORTLANDT<sup>1</sup>

In de nieuwe richtlijn 'Laboratoriumonderzoek bij monoklonale gammopathie' opgesteld door de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie, het College van Medisch Immunologen van de Nederlandse Vereniging voor Immunologie en de Stichting Hemato-Oncologie voor Volwassenen in Nederland, welke een aanvulling is op de CBO-richtlijn 'Monoklonale gammopathie' van 2001, is de kwantificering van Bence Jones eiwitten in urine opgenomen als één van de criteria voor het stellen van de diagnose multiple myeloom (1). Verder is het vervolgen van de concentratie Bence Jones eiwitten in urine belangrijk voor het monitoren van de progressie van de ziekte en voor de beoordeling van het effect van de therapie. Bij ongeveer 65% van de patiënten met een multiple myeloom zijn Bence Jones eiwitten in de urine aantoonbaar (2, 3). Oorspronkelijk werden Bence Jones eiwitten herkend door hun temperatuur afhankelijke oplosbaarheid (4). Bence Jones eiwitten zijn monoklonale vrije lichte ketens van immunoglobuline moleculen die in overmaat geproduceerd worden door één kloon B-lymfocyten of ontstaan door het uiteenvallen van het oorspronkelijke complete monoklonale immunoglobuline (5). Vrije lichte ketens kunnen de glomerulus passeren, maar worden in de tubuli voor 90% teruggeresorbeerd. Bij overproductie van monoklonale vrije lichte ketens wordt het terugsorptie mechanisme overschreden en kunnen monoklonale vrije lichte ketens tevens neerslaan wat leidt tot een toename van de uitscheiding in de urine.

Een gevalideerde methode om Bence Jones eiwitten in urine te kwantificeren is in veel laboratoria niet voor handen. Wij ontwikkelden en valideerden een sensitive methode om Bence Jones eiwitten in urine te kwantificeren door middel van agarose gelelectroforese en toevoeging van een interne standaard met bekende concentratie dierlijk albumine. De methode wordt door ons inmiddels al meerdere jaren toegepast.

### Materiaal en methoden

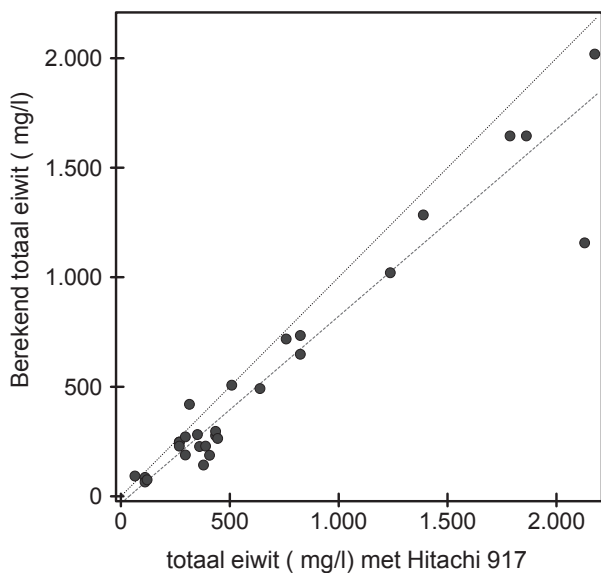
Om de juistheid van de ontwikkelde methode te toetsen is er een vergelijkingsonderzoek uitgevoerd, waarbij de totaal eiwit concentratie berekend met behulp van de toegevoegde interne standaard in de agarose

gelelectroforese wordt vergeleken met de totaal eiwit concentratie gemeten met een turbidimetrische methode op basis van benzetoniumchloride op de Hitachi 917 (Roche, Almere, Nederland). Voor het vergelijkingsonderzoek werden 24-uursurine's verzameld van 36 patiënten. Uit de 24-uurs urinemonsters werd na goed mengen een 2 ml sample gehaald. Urinemonsters werden 5 minuten gecentrifugeerd bij 1300 g en het totaal eiwitconcentratie werd bepaald op de Hitachi 917 (Roche). Bij een eiwitconcentratie groter dan 2,5 g/l werden de urine monsters verdund met fysiologisch zout tot een concentratie van 2,0-2,5 g/l totaal eiwit. Bij een eiwitconcentratie  $\leq 2,5$  g/l werden de urinemonsters direct gemeten en niet geconcentreerd. Vervolgens werd aan 100  $\mu$ l urine 5  $\mu$ l Protur HISI interne standaard (dierlijk albumine in PBS, eindconcentratie 37 mg/l) (Analis, Suarlée, België) toegevoegd en gemengd. De gelelectroforese werd uitgevoerd op de semi-automatische Hydrasys apparatuur (SEBIA, Vilvoorde, België) met Hydragel proteïne 15/30 platen uit de SEBIA Hydragel 30 proteïn(e) kit. 10  $\mu$ l van het mengsel van urine en interne standaard werd geladen op de applicator en samen met bufferstrips en agarosegel platen uit de Hydragel proteïn(e) kit in de Hydrasys gezet. Na electroforese (7,5 minuten applicatie, 11 minuten migratie en 10 minuten drogen, programma HR3) werd de gel verwijderd en 3 minuten gefixeerd met ethanol 96%/azijnzuur (4:1) en gedroogd. Vervolgens werd de gel gekleurd met Acid Violet kleurstof (Sebia) en ontkleurd (10 minuten kleuren, 5,5 minuten ontkleuren en 10 minuten drogen, programma HR3 acid violet). Met de Hyrys2 densitometer (SEBIA) werd de gel gescand. Kwantificering van diverse fracties vond plaats op basis van de procentuele grootte van de diverse fracties gemeten met densitometrie. De hoeveelheid totaal eiwit werd berekend aan de hand van de interne standaard met de volgende formule: totaal eiwit in mg/l =  $(3700 / \% \text{ interne standaard band}) \cdot 37$ . De Bence Jones eiwit in urine werd berekend met de volgende formule: Bence Jones eiwit in mg/l =  $(\% \text{ verdachte band} / \% \text{ interne standaard band}) \times 37$  mg/l. De data werden bewerkt volgens een algoritme zoals beschreven door Passing-Bablok (6).

Verder is de ontwikkelde methode gedurende 24 dagen getest op inter-assay variatie. Bovendien is de intra-variatie gemeten. Voor beide variaties is gebruik gemaakt van in porties ingevroren urinemonsters met bekende concentratie Bence Jones eiwitten. Voor het bepalen van de lineariteit werd in duplo een patiëntenmonster met een zo hoog mogelijke concentratie Bence Jones eiwitten gemengd met fysiologische zout.

Laboratoria voor Klinische Chemie, Hematologie en Immunologie<sup>1</sup> en Medische Microbiologie en Immunologie<sup>2</sup>, Diaconessenhuis Utrecht

E-mail: evbeek@diakhuis.nl

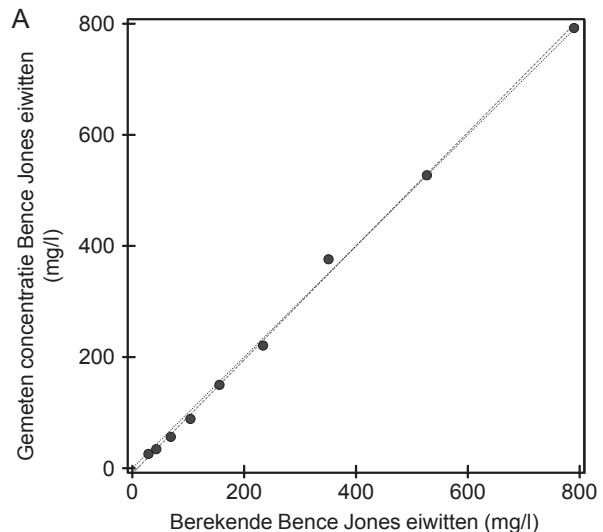


**Figuur 1.** Vergelijking van de totaal eiwit concentratie gemeten op de Hitachi 917 en de berekende totaal eiwit concentratie met behulp van de interne standaard. (Passing-Bablok regressie:  $y = -36,90 + 0,92x$ , 95%-betrouwbaarheidsinterval intercept: -97,00 tot -4,79, 95%-betrouwbaarheidsinterval helling: 0,82 tot 0,98). .....  $y = x$ , ---- Passing-Bablok regressie

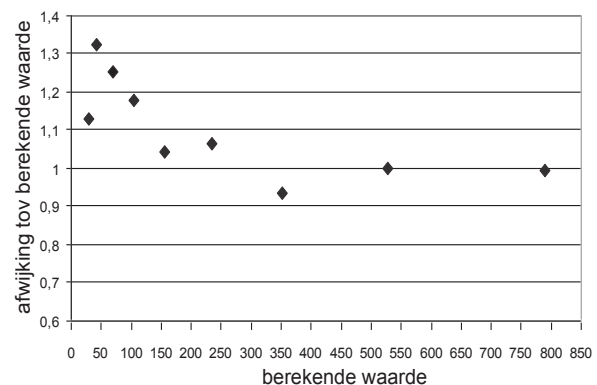
## Resultaten en discussie

Om Bence Jones eiwitten in urine te kwantificeren werd aan elk urinemonster een interne standaard met bekende concentratie dierlijk albumine toegevoegd. Dit dierlijk albumine overlapt in de agarose gelelectroforese niet met humane eiwitten. De juistheid van de methode werd mede bepaald door de aanname dat humane eiwitten met dezelfde intensiteit reageren met het kleurreegens Acid Violet als de interne standaard van dierlijk eiwit. Dit werd getoetst door de totaal eiwit concentratie, berekend met behulp van de interne standaard, te vergelijken met de gemeten totaal eiwit concentratie op de Hitachi 917. De resultaten staan in figuur 1 weergegeven. Er werd een positieve lineaire correlatie tussen beide methoden gevonden ( $r=0,96$ ). Alhoewel de berekende concentraties met behulp van de interne standaard lagere resultaten gaf dan de totaal eiwit concentratie gemeten op de Hitachi 917 ( $y = -36,90 + 0,92x$ ), werd dit geaccepteerd aangezien bekend is dat de huidige gebruikte totaal eiwit bepalingen, waaronder de turbidimetrische methoden op basis van benzetoniumchloride, een wisselende gevoeligheid voor eiwitten en eiwitfragmenten hebben (7).

De inter-assay variatie is bepaald door een patiëntenmonster met een gemiddelde berekende concentratie lichte ketens van 413 mg/l (standaarddeviatie 43,5 mg/l) op 24 verschillende dagen te meten. De inter-assay variatiecoëfficiënt bedroeg 10,5%. De intra-assay variatie ( $n=15$ ) is bepaald in een urinemonster met een berekende concentratie monoclonale vrije lichte ketens van 84 en 244 mg/l. De intra-assay variatiecoëfficiënt bedroeg 7,5% bij een berekende concentratie aan monoclonale vrije lichte ketens van 244 mg/l (standaarddeviatie 18,3 mg/l) en 10,8% bij een concentratie van 84 mg/l (standaard-



## B



**Figuur 2.** Lineariteit van de bepaling van Bence Jones eiwitten in urine. In A staat de berekende concentratie Bence Jones eiwitten ten opzichte van de gemeten concentratie weergegeven. .....  $y = x$ , ---- Lineariteitslijn Bence Jones eiwitten. In figuur B is de berekende waarde tegen afwijking ten opzichte de berekende waarde uitgezet.

deviatie 9,1 mg/l). Onder de concentratie van 60 mg/l liep de variatiecoëfficiënt nog verder op, waardoor de detectiegrens voor Bence Jones eiwitten in urine op 60 mg/l werd gesteld. De lineariteit van de Bence Jones eiwit meting is onderzocht tussen 30 en 790 mg/l. De resultaten van de lineariteitsbepaling zijn op twee manieren weergegeven in figuur 2. De lineariteit is goed, de gevonden lineariteitslijn wijkt niet meer dan 5% af van  $Y=X$  ( $r=1,0$ ).

Samengevat is kwantificering van Bence Jones eiwitten in urine met behulp van agarose gelelectroforese onder toevoeging van een interne standaard een sensitive en betrouwbare methode om Bence Jones eiwitten in urine te kwantificeren. Voordelen van de methode zijn dat monsters niet geconcentreerd hoeven te worden en dat de detectiegrens op 60 mg/l Bence Jones eiwitten in urine ligt. Met de beschreven methode kan worden voldaan aan de nieuwe richtlijnen voor monoclonale gammopathie, waarin kwantificeren van de Bence Jones eiwitten in urine is opgenomen als één van de criteria voor het stellen van de diagnose multiple myeloom (1).

## Referenties

1. Ruineman-Koerts JG, Boonstra JG, Klases IS, Zweegman S, Minnema MC, Wegman JJ, et al. Laboratoriumonderzoek bij monoklonale gammopathie: detectie van monoklonale immunoglobulinen. *Ned Tijdschr Hematol.* 2011; 8: 160-168.
2. Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. *Essential Haematology*, 5th ed. Blackwell Publishing Professional. 2006: 218 pp.
3. Kyle RA. Multiple myeloma: review of 869 cases. *Mayo Clin Proc.* 1975; 50: 29-40.
4. Jones HB. *Chemical Pathology.* *Lancet.* 1847; 2: 88-92.
5. Merlini G, Aguzzi F, Whicher J. Monoclonal gammopathies. *J Int Fed Clin Chem.* 1997; 9: 171-176.
6. Passing H, Bablok. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1983; 21: 709-720.
7. Brinkman JW, Ijpelaar DHT, Schrandt-van der Meer AM, Jonkers GJPM, Beijer C. Het gebrek aan sensitiviteit en specificiteit van de totaaleiwitbepaling voor de detectie van monoklonale vrije lichte ketens in urine. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk.* 2011; 36: 11-15.

*Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2012; 37: 219-221

## Verbeterde Cushing speekseldiagnostiek m.b.v. eigen UPLC MS/MS methode die onderscheid maakt tussen cortisol en cortison

A.K. BOER<sup>1</sup>, D. van den HEUVEL<sup>1</sup> en E. LENTJES<sup>2</sup>

De afgelopen jaren heeft de middernacht speekselcortisol zijn intrede gedaan in de Cushing diagnostiek. Twee meta-analyses van meer dan 10 studies laten zien dat speekselcortisol een zeer betrouwbare marker is voor het syndroom van Cushing met een sensitiviteit van minstens 92-96% en een specificiteit van 88-96% (1, 2). In de richtlijn van bijvoorbeeld de Endocrine Society heeft de middernachtspeekselcortisol dan ook een prominente plaats gekregen (3). Groot nadeel is dat deze studies en richtlijnen gebaseerd zijn op immunologische cortisol bepalingen die sterk kruisreageren met cortisol precursors en metabolieten. Er zijn bijvoorbeeld commerciële cortisolbepalingen die kruisreageren met cortison, wat kan oplopen tot 31% (4). Wij hebben een massaspectrometrische bepaling opgezet die zeer specifiek onderscheid maakt tussen cortisol en cortison.

### Methode

Aan dit onderzoek hebben 268 patiënten, voor wie een plasmacortisol was aangevraagd, en 25 laboratoriummedewerkers vrijwillig geparticipeerd en zij hebben gedurende 1 minuut gekauwd op een synthetisch watje van een Salivette (Sarstedt, 51.1534.500). Daarnaast zijn 57 middernacht speeksels geanalyseerd van (pseudo) Cushing patiënten met zowel een immunologische (RIA, UMCU) als massaspectrometrische techniek. De salivettes werden ingevroren (-20°C) tot

analyse. Na ontdooien werd 250 µl speeksel met 25 µl interne standaard (10 µg/L D<sub>4</sub>-cortisol (Sigma Aldrich 705594) in methanol/H<sub>2</sub>O (50%/50%)) geëxtraheerd met dichloormethaan middels 30 seconden vortexen. Na afdraaien (10 minuten, 2682g, 21°C) werd het supernatant en interface verwijderd. De dichloormethaan werd onder stikstof drooggedampt (37°C). Het residu werd opgelost in 100 µl methanol/H<sub>2</sub>O (50%/50%) en 30 seconden gevortext. Na centrifugeren (2 minuten, 490g, 21°C) werd 15 µl geïnjecteerd op een Waters Acquity UPLC MS/MS systeem en gescheiden middels een gradiënt (methanol H<sub>2</sub>O (+0,1% mierenzuur en 2 mmol/l ammoniumacetaat) van 45/55% naar 2/98%). Met behulp van een ijkreeks en de interne standaard (MRM 367,10 → 121,1), werden de massaovergangen van cortisol en cortison (respectievelijk 363,15 → 120,98 en 361,05 → 162,86) gekwantificeerd.

### Resultaat

De opgezette LC MS/MS methode voor cortisol en cortison is zeer specifiek omdat enerzijds de UPLC de componenten chromatografisch scheidt en anderzijds de MS kijkt naar specifieke massaovergangen. Cortisol en cortison hebben als retentietijd respectievelijk 1,15 en 1,00 minuten en zijn volledig basislijn-gescheiden. Zonder de chromatografische scheiding zal een natuurlijke isotoop van cortison in de massaovergang van cortisol worden meegenomen. Bij de middernachtspeeksels differentieert speekselcortison beter tussen onbehandelde Cushingpatiënten (n=7) en (maligne) hypertensiepatiënten (n=34) dan speekselcortisol (figuur 1). De optimale afkapgrens voor middernachtcortisol ligt bij <5 nmol/l en voor cortison bij <25 nmol/l (zie tabel 1). Voor cortisol ligt dit halverwege het referentie-interval, waardoor de specificiteit

*Algemeen Klinisch Laboratorium Catharina Ziekenhuis (CZE)<sup>1</sup>, Eindhoven en Lab Klinische Chemie en Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU) locatie WKZ<sup>2</sup>, Utrecht*

E-mail: Arjen\_Kars.Boer@cze.nl