

## Short communications

# Screening op M-proteïne: vergelijking agarosegel-eiwitelektroforese met capillaire eiwitelektroforese

A.J. BAKKER<sup>1</sup>, C. ELDERMAN-van der WERF, L. HERRARTI, T. van ABBEMA, M.A. SPRINGER, P.M.J. MCLAUGHLIN en J.J. VAN ZANDEN

### Inleiding

Onderzoek naar aan- of afwezigheid van een M-proteïne conform de CBO-richtlijn (1) is veelal tijdrovend door een combinatie van de aard van de analysemethode en de opeenvolging van de uitvoering van eiwitspectrum en immunofixatie, met name 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 niet afhankelijk is van een min of meer vaste seriegrootte en werkt met positieve monsteridentificatie. Tevens kan na analyse direct immunotypering worden uitgevoerd. In deze studie is onderzocht of het screenend onderzoek van het eiwitspectrum met capillaire elektroforese een even betrouwbaar en sneller alternatief is voor de agarosegel-eiwitelektroforese bij het opsporen/uitsluiten van M-proteïnemie.

### Methoden

738 opeenvolgende patiënten, waarvoor onderzoek naar aan-/afwezigheid van een M-proteïne was aangevraagd, zijn geïnccludeerd. Van 166 patiënten bleek dat ze al bekend waren met een M-proteïne, terwijl 572 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 werd uitgevoerd met de SAS-3-SP-60 SB kit (Helena, art. no.: 300200) op de SPIFE 2000 (Helena Biosciences, Sysmex Nederland BV, Etten-Leur.). 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. De immunofixaties werden eveneens uitgevoerd met de SPIFE 2000. Capillaire elektroforese werd uitgevoerd met de Capillarys Proteïne 6 kit (Sebia, art.nr. 2003) op de Capillarys-2 (Sebia

Benelux s.a., Brussel, België). 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, d.w.z. bij aanwezigheid van een extra band, bij hypogammaglobulinemie ( $\gamma$ -gebied  $<6$  g/l op basis van agarosegel-elektroforese) en bij afwijkingen in het patroon van de beide  $\beta$ -banden, als positief beschouwd en werd een immunofixatie met specifieke antisera nodig geacht. In het geval van een normaal eiwitspectrum, bij een acutefasepatroon, een hypergammaglobulinemie en bij  $\beta$ - $\gamma$ -'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 als 'gouden standaard' gebruikt. Een positief resultaat met de immunofixatie met het pentavalente antiserum werd gevolgd door een immunofixatie met de specifieke antisera, enerzijds voor het bewijzen van monoklonaliteit en anderzijds voor het typeren van het immuunglobuline. 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  $\beta$ - en  $\gamma$ -gebied en bij hypogammaglobulinemie ( $\gamma$ -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-2002.

### Resultaten

Voor een direct vergelijk tussen beide methoden voor de eiwitelektroforese zijn de concentraties van de verschillende eiwitfracties met elkaar vergeleken. Hiervoor zijn 506 monsters gebruikt waarin geen M-proteïne is aangetoond. De correlatiegegevens van het vergelijk tussen de fracties is in tabel 1 weergegeven. Tevens zijn voor de monsters waar een meetbare concentratie van een M-proteïne aantoonbaar was ( $n=118$ ), de gemeten concentraties van beide methoden vergeleken. M-proteïnes waarvan de concentratie niet te kwantificeren was wegens een te lage concentratie, d.w.z.  $<0,5$  g/l ( $n=70$ ), of waarvan de band niet te scheiden was

*St. Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden*

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

**Tabel 1.** Correlatiegegevens voor de correlaties tussen de verschillende eiwitfracties gemeten in monsters zonder M-proteïne met agarose-gelelektroforese (AGE) en capillaire eiwitelektroforese (CE). Tevens zijn vermeld de correlatiegegevens van de kwantificering van de M-proteïnes met beide methoden (CI = confidence interval).

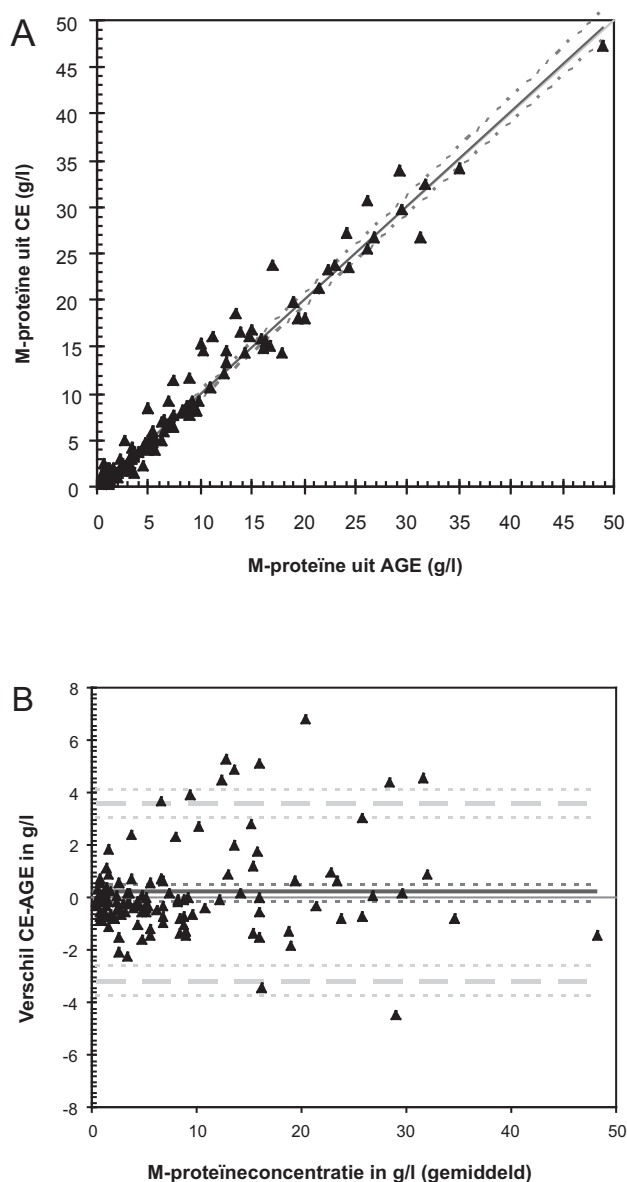
| Regressielijn (Passing-Bablok)                                | Aantal | R <sup>2</sup> | 95%-CI <sub>helling</sub> | 95%-CI <sub>asafsnede</sub> | Bias   | 95%-CI <sub>bias</sub> |
|---------------------------------------------------------------|--------|----------------|---------------------------|-----------------------------|--------|------------------------|
| Albumine <sub>CE</sub> = 1,10x Albumine <sub>AGE</sub> - 1,96 | 508    | 0,92           | 1,07 – 1,13               | -3,02 – -0,82               | 1,665  | 1,519 – 1,811          |
| Alfa-1 <sub>CE</sub> = 1,21x Alfa-1 <sub>AGE</sub> + 0,25     | 508    | 0,72           | 1,14 – 1,28               | 0,07 – 0,41                 | 0,80   | 0,76 – 0,84            |
| Alfa-2 <sub>CE</sub> = 0,95x Alfa-2 <sub>AGE</sub> + 0,27     | 508    | 0,82           | 0,91 – 0,98               | -0,02 – 0,54                | -0,176 | -0,234 – -0,119        |
| Beta-1 <sub>CE</sub> = 0,62x Beta-1 <sub>AGE</sub> + 0,72     | 508    | 0,53           | 0,57 – 0,67               | 0,45 – 0,99                 | -1,42  | -1,48 – -1,37          |
| Beta-2 <sub>CE</sub> = 1,06x Beta-2 <sub>AGE</sub> - 0,66     | 508    | 0,70           | 1,01 – 1,12               | -0,88 – -0,45               | -0,37  | -0,41 – -0,33          |
| Gamma <sub>CE</sub> = 0,92x Gamma <sub>AGE</sub> + 0,22       | 508    | 0,95           | 0,91 – 0,94               | 0,01 – 0,40                 | -0,55  | -0,61 – -0,48          |
| M-prot <sub>CE</sub> = 1,02x M-prot <sub>AGE</sub> - 0,28     | 118    | 0,97           | 0,99 – 1,05               | -0,54 – -0,12               | 0,18   | -0,14 – 0,49           |

één van de normale  $\beta$ -banden bij agarosegel-elektroforese (n=27) en/of capillaire elektroforese (n=37), zijn bij dit vergelijk uitgesloten. De correlatiegegevens zijn in tabel 1 opgenomen en de resultaten zijn weergegeven in figuur 1. In 8 gevallen was een M-proteïne dat eerder aanwezig was, niet meer aantoonbaar.

De effectiviteit van de M-proteïnescreening via de eiwitelektroforese met agarosegel-elektroforese en capillaire elektroforese werd vergeleken in 572 patiënten die niet bekend waren met een M-proteïne. De beoordelingen van de patronen van de capillaire elektroforese werden onafhankelijk van elkaar uitgevoerd door 1 medewerker van Sebia en 3 van de eigen medewerkers. Door deze 4 beoordelaars werden resp. 460 (80,4%), 432 (75,5%), 420 (73,4%) en 514 (89,9%) patronen als negatief beoordeeld, waarbij 16, 10, 11 en 31 monsters met een klein bandje of een bandje onder een  $\beta$ -band (1/1/1/4) werden gemist. Dit resulteerde in een negatief-voorspellende waarde (NPV) van 96,5%, 97,6%, 97,3% en 93,9%, terwijl met de agarosegelelektroforese met een NPV van 99,5% (431/433) slechts 2 bandjes die onder een  $\beta$ -band zaten werden gemist. De klinische betekenis van het missen van deze bandjes met een geringe concentratie M-proteïne is niet nader onderzocht. De positief-voorspellende waarde (PPV) voor de beoordeling van de capillaire elektroforese was resp. 42,9% (48/112), 39,2% (55/140), 35,5% (54/152) en 58,0% (34/58), terwijl de agarosegelelektroforese een PPV had van 44,6% (62/139).

### Conclusies

Het gebruik van capillaire elektroforese bij de 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 weggevoerd. Primaire buizen kunnen met positieve monsteridentificatie worden aangeboden aan het systeem voor capillaire elektroforese; bij agarosegel-elektroforese is door het gebruik van secundaire buizen, het overbrengen van monstertray's naar de elektroforesemodule en het overbrengen van de geëlektroforeerde plaat naar de kleurmodule meer hands-on-tijd nodig. Bovendien kan bij capillaire elektroforese de immunotypering onder dezelfde elektroforetische condities plaatsvinden zonder dat opnieuw moet worden gewacht totdat



**Figuur 1.** (A) Vergelijking van de concentraties M-proteïne uit het eiwitspectrum verkregen via AGE, CE en (B) de bland-altmanplot. A: ———  $Y = X$ ; ———  $Y = 1.02X - 0.28$  (Passing-Bablok); - - - - 95%-betrouwbaarheidsgrenzen. B: ——— bias (0.18); - - - - 95%-betrouwbaarheidsinterval bias; ····· 95% range van verschillen; - - - - 95%-betrouwbaarheidsinterval van verschilrange.

een volle serie wordt verkregen, zoals bij agarosegel-elektroforese. Dit betekent bij duidelijke banden dat ook de immunotypering direct kan worden afgewerkt. Bij de beoordeling van de eiwitpatronen van de capillaire elektroforese wordt de aanwezigheid van monoklonale bandjes minder vaak herkend dan bij agarosegel-elektroforese. Waar bij de agarosegel-elektroforese bij de 433 als negatief beoordeelde eiwitspectra slechts 2 bandjes zijn gemist omdat deze bandjes met een lage concentratie M-proteïne onder een  $\beta$ -band vallen (dit werd in een eerdere studie ook gezien (2)), worden met capillaire elektroforese vaker kleine bandjes (11 à 15 op 450 negatieve beoordelingen) gemist. De verschillen tussen de 4 beoordelaars zijn vermoedelijk te wijten aan de wijze van beoordelen (aan het scherm of op papier) en de mate van ervaring in het beoordelen van eiwitspectra in het algemeen. Voor de beoordeling

hoe ernstig het missen van deze bandjes met geringe concentratie is, is nog nader onderzoek van de patiëntengegevens nodig.

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

#### Referenties

1. Kwaliteitsinstituut voor de gezondheidszorg CBO. Monoklonale gammopathie (paraproteïnemie). Utrecht: CBO; 2001.
2. Bakker AJ, Bierma-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.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2010; 35: 170-172

## Het effect van chymotrypsine op de viscositeit van semen en de motiliteit van zaadcellen

C. BEIJER<sup>1</sup>, A.J.van der PLAS<sup>1</sup> en A. WETZELS<sup>2</sup>

### Inleiding

De Werkgroep 'Semen' beschrijft in haar praktijkrichtlijn 'Controle na Vasectomie' (1) het probleem van een niet-homogene verdeling van zaadcellen in semen met een verhoogde viscositeit, met als risico een niet correcte resultaatweergave van de concentratie aan zaadcellen in dergelijke monsters. Het probleem van een niet-correcte resultaatweergave is nog nijpender geworden sinds de Nederlandse Vereniging voor Urologie een grens heeft gesteld van 100.000 niet-motiele zaadcellen per ml semen voor een geslaagde vasectomie (2). De verhoogde viscositeit van semen kan ook in overig semenonderzoek een foutief resultaat geven in de bepaling van de zaadcelconcentratie en de motiliteit van zaadcellen. De mogelijkheid bestaat om proteases, zoals bromeline (advies WHO (3)), chymotrypsine of trypsine aan semen toe te voegen om de viscositeit van het semen te verlagen en aldus een homogene verdeling van de zaadcellen te bevorderen. Het effect van de activiteit van proteases op de viscositeit van semen en op de motiliteit van zaadcellen is echter nauwelijks onderzocht (4). Teneinde zaadcellen tegen een mogelijke proteolyse te beschermen t.g.v. het

toedienen van exogene proteases verdient het aanbeveling de exogene toe te dienen activiteit aan proteases zo te kiezen dat er een voldoende effect is op de viscositeit maar geen nadelig effect op de motiliteit van zaadcellen. Teneinde het effect van de activiteit van proteases op de viscositeit van semen objectief vast te kunnen stellen wordt de viscositeit gemeten voor en na toevoegen van chymotrypsine. De WHO (3) beschrijft voor het bepalen van de viscositeit van semen een 'kwalitatieve' methode. Het doel van het hier beschreven onderzoek is:

1. het bepalen van de viscositeit van semen met een methode welke een 'kwantitatief' resultaat oplevert;
2. het vaststellen m.b.v. deze methode van het effect van het toevoegen van chymotrypsine op de viscositeit van semen;
3. het vaststellen of het toevoegen van chymotrypsine aan semen wel of geen nadelig effect heeft op de motiliteit van zaadcellen.

### Methoden

Het gebruikte semen was restmateriaal afkomstig van semenmonsters aangeboden voor een uitgebreide semenanalyse.

#### Viscositeitmetingen van semen

De huidige 'kwalitatieve' methode is beschreven door de WHO (3). Bij deze methode wordt semen opgezogen in een 5-ml-pipet en wordt de viscositeit

Rijnland ziekenhuis, Klinisch Chemisch Laboratorium, Leiderdorp<sup>1</sup> en UMC St Radboud, Verloskunde en Gynaecologie, Nijmegen<sup>2</sup>

E-mail: C.Beijer@Rijnland.nl