

17. Drakesmith H, Schimanski LM, Ormerod E, Merryweather-Clarke AT, Viprakasit V, Edwards JP, Sweetland E, Bastin JM, Cowley D, Chinthammitr Y, Robson KJ, Townsend AR. Resistance to hepcidin is conferred by hemochromatosis-associated mutations of ferroportin. *Blood*. 2005; 106: 1092-7.
18. Lee PL, Beutler E. Regulation of hepcidin and iron-overload disease. *Annu Rev Pathol*. 2009; 4: 489-515. Review.
19. Oates PS. The role of hepcidin and ferroportin in iron absorption. *Histol Histopathol*. 2007; 22: 791-804.
20. Nemeth E. Ferroportin mutations: a tale of two phenotypes. *Blood*. 2005; 105: 3763-4.
21. Papanikolaou G, Tzilianos M, Christakis JI, Bogdanos D, Tsimirika K, MacFarlane J et al. Hepcidin in iron overload disorders. *Blood*. 2005; 105: 4103-5.
22. Camaschella C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood*. 2005; 106: 3710-7.
23. Sham RL, Phatak PD, Nemeth E, Ganz T. Hereditary hemochromatosis due to resistance to hepcidin: high hepcidin concentrations in a family with C326S ferroportin mutation. *Blood*. 2009; 114: 493-4.
24. Sham RL, Phatak PD, West C, Lee P, Andrews C, Beutler E. Autosomal dominant hereditary hemochromatosis associated with a novel ferroportin mutation and unique clinical features. *Blood Cells Mol Dis*. 2005; 34: 157-61.

Summary

Wijngaarden P van, Hoskam J, Koeken A, Boer JMA, Swinkels DW, Ermens AAM, Cobbaert CM. Hereditary hemochromatosis due to ferroportin-gene mutations; significance for hepcidin measurement as screening tool? Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk. 2011, 36: 6-11.

Hereditary hemochromatosis (HH) refers to several inherited disorders of iron metabolism leading to tissue iron overload. Several of these are caused by rare mutations like the N144H ferroportin-gene mutations. The ferroportin-gene mutations can be subdivided in 2 groups, the so called 'loss of function' and the 'gain of function' group. We describe two young men and one aged man with hereditary hemochromatosis due to a 'gain of function' ferroportin-gene mutation. The detection of the N144H ferroportin-gene mutation with the current hereditary hemochromatosis guideline in The Netherlands is discussed, as well as the pathophysiology of iron overload and the role of hepcidin as a possible diagnostic screening tool. The patients were diagnosed according to the Dutch guideline concerning hereditary hemochromatosis. In all patients the ratio serum hepcidin concentration/ferritin was normal. In case of hereditary hemochromatosis due to HFE gene mutations this ratio will be decreased. When iron overload has been diagnosed and testing for HFE gene mutation appears negative, the serum hepcidin/ferritin ratio prompts examining other gene mutations like the 'gain of function' ferroportin gene mutation.

Keywords: ferroportin N144H gene mutation; hemochromatosis; hepcidin

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2011; 36: 11-15

Het gebrek aan sensitiviteit en specificiteit van de totaaleiwitbepaling voor de detectie van monoklonale vrije lichte ketens in urine

J.W. BRINKMAN¹, D.H.T. IJPELAAR², A.M. SCHRANDER-van der MEER², G.J.P.M. JONKERS² en C. BEIJER^{1,3}

Laboratoriumonderzoek naar monoklonale gammopathie speelt een essentiële rol in de diagnostiek van hematologische maligniteiten en auto-immuunaandoeningen. Vanwege de complexiteit van de diagnostiek naar M-proteïnen wordt in veel ziekenhuislaboratoria gebruik gemaakt van richtlijnen met daarin adviezen omtrent uitvoering en interpretatie van het laboratoriumonderzoek hiernaar. Een veel gebruikte richtlijn is de CBO-richtlijn 'Monoklonale Gammopathie' uit 2001 waarin aanbevelingen gedaan worden omtrent zowel screenend als vervolgonderzoek naar M-proteïne in bloed en urine. Hoewel in een groot deel van de patiënten deze richtlijn in de praktijk

zeer bruikbaar is gebleken, blijkt deze in onze casus niet zonder meer toepasbaar. Zo beschrijft de CBO-richtlijn dat bij een totaaleiwitconcentratie in de urine van boven 200 mg/l aanvullend onderzoek naar monoklonale vrije lichte ketens geïndiceerd is. De huidige gebruikte totaaleiwitassays zijn echter niet sensitief en specifiek genoeg waardoor de diagnose van M-proteïne gemist kan worden. Dit, in overeenstemming met de publicatie van Brigden et al. (1). Naar aanleiding van deze casus wordt een overzicht gegeven van de analysemethoden van totaaleiwit en monoklonale vrije lichte ketens in urine en de valkuilen die zich daarbij voor kunnen doen.

Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Diaconessenhuis, Leiden; Interne Geneeskunde² en Klinisch Chemisch Laboratorium³, Rijnland Ziekenhuis, Leiderdorp

Correspondentie: dr. J.W. Brinkman, LUMC, CKCL, Postzone E2-P, Kamer E2-21, Postbus 9600, 2300 RC Leiden
E-mail: j.w.brinkman@lumc.nl

Laboratoriumonderzoek naar monoklonale gammopathie speelt een essentiële rol in de diagnostiek van hematologische maligniteiten en auto-immuunaandoeningen (2). Vanwege de complexiteit van de interpretatie van deze diagnostiek is in 1990 de eerste CBO-richtlijn 'Onderzoek bij paraproteïnemie' ver-

schenen met daarin adviezen over laboratoriumonderzoek, beeldvorming, cytologie en histologie. In 2001 is een herziene versie van deze richtlijn verschenen met daarin de meest recente ontwikkelingen (3). In veel ziekenhuislaboratoria wordt deze richtlijn toegepast. Medio 2011 zal de NVKC/NVvI/HOVON-richtlijn M-proteïneonderzoek verschijnen waarin de nieuwste ontwikkelingen op het gebied van monoklonale gammopathie verwerkt zijn. Hoewel de afgelopen jaren is gebleken dat de richtlijn een goed handvat biedt in de diagnostiek, beschrijven wij een casus waarbij de richtlijn 'Monoklonale Gammopathie' niet toepasbaar bleek.

Patiëntcasus

Een 82-jarige man, bekend met hypertensie, transurethrale resectie van de prostaat en claudicatio intermittens ('etalagebenen'), werd door de huisarts verwezen naar de internist-nefroloog in verband met nierinsufficiëntie en anemie. Hij had af en toe klachten van diarree. Van nachtzweeten was geen sprake. Bij forse inspanning vermeldt hij af en toe thoracale klachten te hebben. Het lichamelijk onderzoek was niet afwijkend. Als medicatie gebruikte hij isosorbidedinitraat, statine, nifedipine retard, oros, ACE-remmer, carbasa-laalcium, omeprazol en loperamide. Het bloedonderzoek toonde: Hb 6,1 mmol/l, ureum 18,9 mmol/l, creatinine 276 µmol/l (eGFR 19 ml/min/1,73m²), albumine 41 g/l, totaaleiwit 86 g/l. Urineonderzoek liet een totaaleiwitconcentratie van 150 mg/l zien. Andere resultaten van laboratoriumonderzoek vertoonden geen afwijkingen. CRP en bezinking werden niet bepaald; er was geen aanwijzing voor infectie. Naar aanleiding van de normocytair anemie zonder ijzer- of vitamine-B12-deficiëntie werd gedacht aan renale anemie veroorzaakt door hypertensieve nefropathie. Om de oorzaak van de nierinsufficiëntie verder te onderzoeken werd echografisch onderzoek van de nieren verricht, hetgeen echorijk parenchym toonde passend bij nefropathie. Een M-proteïne in het serum was niet aantoonbaar, wel werden vrije lichte ketens (monoklonaal kappa) in de urine gevonden. X-skelet toonde een laesie in de os frontale en in het femur, verder werden geen afwijkingen gevonden. Gezien de aanwezigheid van monoklonale vrije lichte ketens in de urine werd een beenmergbiopsie verricht waarin groepjes plasmacellen werden gezien en dysplasie van de erytropoëse en myelopoëse met 6% myeloblasten. Het aantal plasmacellen bleek niet voldoende voor de diagnose ziekte van Kahler. Dit beeld bleek wel te passen bij een myelodysplastisch syndroom (MDS) type RAEB I. Het beenmergaspiraats liet daarentegen tekenen van een MGUS zien. De patiënt startte met 4000 IE erytropoëtin (Neorecormon®) en het bloedbeeld werd vervolgd. Na een jaar werd nog geen M-proteïne in het bloed gevonden en het Hb bleef constant. De patiënt staat thans onder frequente controle voor zijn MDS.

Beschouwing

In het Klinisch Chemisch Laboratorium van het Rijnland Ziekenhuis te Leiderdorp wordt de M-proteïne diagnostiek uitgevoerd zoals voorgesteld in de CBO-richtlijn 'Monoklonale Gammopathie' welke

verschenen is in 2001. In deze richtlijn worden aanbevelingen gedaan die betrekking hebben op zowel de klinische als de laboratoriumdiagnostiek van monoklonale gammopathieën. Er wordt hierbij onderscheid gemaakt tussen respectievelijk oriënterend en gericht laboratoriumonderzoek naar de eventuele aanwezigheid van een M-proteïne of de follow-up van een bekend M-proteïne. Het oriënterend onderzoek in serum bestaat uit een eiwit elektroforese welke uitgevoerd kan worden indien er sprake is van respectievelijk een hoge bezinking, hoog totaaleiwit, onverklaarbaar laag albumine of algemene malaise (3). Oriënterend onderzoek in de urine wordt ingezet indien er sprake is van totaaleiwit in de urine met een concentratie groter dan 200 mg/l met onbekende oorzaak. Gericht onderzoek in serum (M-proteïne), in de vorm van eiwit elektroforese aangevuld met immunofixatie, vindt plaats indien er een vermoeden is op een hematologische maligniteit of neuropathie. Gericht onderzoek in de urine wordt uitgevoerd indien er sprake is van een vermoeden op monoklonale vrije lichte ketens in de urine. In het Rijnland Ziekenhuis wordt voor de monoklonale gammopathiediagnostiek gebruik gemaakt van het Sebia elektroforese- en immunofixatiesysteem.

Bovenstaande patiëntencasus beschrijft een klinisch beeld waarbij, indien de diagnostiek uitgevoerd wordt volgens de aanbevelingen van de CBO-richtlijn 'Monoklonale Gammopathie' (paraproteïnemie), geen indicatie is voor oriënterend of gericht M-proteïneonderzoek. Het algemeen laboratoriumonderzoek vertoonde naast de verlaagde Hb-concentratie en de afgenomen creatinineklaring geen afwijkingen. Verder was er geen sprake van een verdenking op een hematologische maligniteit. Ondanks deze bevindingen verzocht de internist-nefroloog na overleg met de betreffende klinisch chemicus het laboratoriumonderzoek naar M-proteïne in serum in te zetten om zo de oorzaak van de nierinsufficiëntie te onderzoeken. Een M-proteïne in serum was niet aantoonbaar. Ondanks deze negatieve bevinding en het feit dat de totaaleiwitconcentratie kleiner dan 200 mg/l was, werd na overleg met de klinisch chemicus besloten monoklonale vrije lichte ketens in urine te bepalen om deze oorzaak voor de nierinsufficiëntie te kunnen uitsluiten. Bij dit onderzoek werden vervolgens wel monoklonale vrije lichte kappa-ketens in de urine aangetoond.

Deze laatste bevinding is onverwacht aangezien de richtlijn aanbeveelt onderzoek naar monoklonale vrije lichte ketens pas in te zetten indien de concentratie totaaleiwit in urine hoger is dan 200 mg/l: ten eerste is volgens de richtlijn alleen aanvullend onderzoek geïndiceerd indien er sprake is van een M-proteïne in het bloed. Bij deze patiënt werd M-proteïne diagnostiek aangevraagd vanwege het achterhalen van de oorzaak van de nierinsufficiëntie. Dit onderzoek bleek negatief. Ten tweede wordt aanvullend onderzoek uitgevoerd indien er een sterk vermoeden is op een monoklonale gammopathie; het klinisch beeld en de aanvullende andere (laboratorium)onderzoeken doen bij deze patiënt niet aan een monoklonale gammopathie denken. Ten derde wordt aanvullend onderzoek aanbevolen indien de totaaleiwit concentratie hoger is dan 200 mg/l en

dat bleek bij deze patiënt niet het geval. Er wordt in de richtlijn dus vanuit gegaan dat urine met een totaaleiwitconcentratie van <200 mg/l geen monoklonale vrije lichte ketens bevat of dat dit geen klinische betekenis heeft. In deze casus was volgens de CBO-richtlijn onderzoek naar een M-proteïne dus niet geïndiceerd. Dit bleek echter onterecht.

De onverwacht positieve test op monoklonale vrije lichte kappa-ketens in urine bij een patiënt die niet verdacht wordt van een hematologische maligniteit en met een totaaleiwitconcentratie van kleiner dan 200 mg/l wordt wellicht veroorzaakt door het verschil in sensitiviteit en specificiteit van de totaaleiwitbepaling en de immunofixatietechniek. Deze bevinding was voor ons aanleiding om de verschillende totaaleiwit bepalingen in urine kritisch te onderzoeken op de sensitiviteit en specificiteit voor monoklonale vrije lichte ketens.

De bepaling van totaal eiwit in urine

Het eiwit in de urine van een gezond persoon bestaat uit albumine, Tamm-Horsfall-eiwitten, laagmoleculair gewichteiwitten en fragmenten van immunoglobulinen. In gezonde personen mag men een eiwitexcretie in de urine verwachten van maximaal 100-200 mg per dag (50-100 mg/l) (4-6). De concentratie totaal eiwit in urine kan bepaald worden met een groot scala aan analytische methoden. Deze methoden zijn echter berucht om hun gebrek aan specificiteit (7). Wellicht de meest bekende methode om eiwit in urine te bepalen is de biureet methode welke is gebaseerd op de binding van koperionen met stikstofatomen in peptiden in een basisch milieu. Van de biureetmethode is bekend dat deze kruisreactiviteit vertoont met aminozuren, ureum en creatinine (8). Voorts wordt veel gebruik gemaakt van turbidimetrische methoden op basis van trichloorazijnzuur, sulfosalicylzuur of benzethoniumchloride. Turbidimetrische methoden vertonen een wisselende affiniteit voor eiwitfragmenten, albumine, globulinefracties en Tamm-Horsfall-proteïne (7, 9, 10). De sulfosalicylzuurassay detecteert naast albumine en immunoglobulinen ook monoklonale vrije lichte ketens. Echter, de gevoeligheid van de assay voor monoklonale vrije lichte ketens is heel wisselend en daarnaast is er sprake van positieve interferentie van medicatie, waaronder penicilline en tolbutamine (11).

Andere veel gebruikte routinemethoden voor de analyse van eiwit in de urine zijn de zogenaamde dye-bindingmethoden. Deze methoden zijn gebaseerd op kleurreacties van eiwit met pyrogallolrood, Ponceau S en coomassie brilliant blue. De dye-bindingmethode is gebaseerd op het principe van de herkenning van de verschillende aminozuren waaruit het eiwit is opgebouwd. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de mogelijkheid van eiwitten om kleurstof te binden. Deze binding berust ofwel op de aminozuurvolgorde van de individuele eiwitten ofwel op de hoeveelheid basische aminozuren waaruit het eiwit is opgebouwd. Aangezien deze eigenschappen tussen eiwitten verschillend zijn, is de mate van detectie van de diverse soorten eiwitten ook in grote mate verschillend. Zo hebben monoklonale vrije lichte ketens een molecuulmassa van 22 of 44 kDa voor de monomere of dimere structuur, respectievelijk, en bestaan de monomere structuren uit

210 aminozuren waarvan ongeveer 10% basische aminozuren (12-14). Albumine daarentegen bestaat voor 17% uit basische aminozuren. De pyrogallolmethode zal daarom gevoeliger zijn voor albumine dan voor monoklonale vrije lichte ketens.

In Nederland zijn de nat-chemische biureet (n=165), pyrogallol (n=266) en benzethoniumchloride (n=390) de meest gebruikte methoden (bron: SKML). Zoals hierboven beschreven hebben deze methoden aldus een wisselende gevoeligheid voor de individuele eiwitten en eiwitfragmenten waardoor deze methoden een onderschatting geven van het aantal laagmoleculaire eiwitten en (monoklonale) vrije lichte ketens en dus niet geschikt zijn voor onderzoek naar vrije lichte keteneiwitten in borderlinegevallen.

De bepaling van monoklonale vrije lichte ketens in urine

Gezonde personen hebben een kleine hoeveelheid vrije lichte ketens in hun bloed welke worden gefiltreerd door de glomerulus en voor 90% tubulair teruggesorbeerd en in de circulatie teruggebracht worden. Het betreft in deze situatie polyklonale vrije lichte ketens van immunoglobulinen. Deze polyklonale vrije lichte ketens worden geproduceerd door B-cellen die deze ketens in gezonde personen altijd in overmaat produceren ten opzichte van de zwareketenimmunoglobulinen. Deze vrije lichte ketens worden normaliter door de nieren gefiltreerd en daarom zullen de concentraties in serum toenemen indien er sprake is van een verminderde nierfunctie. In patiënten met monoklonale gammopathie, zoals de ziekte van Kahler, vindt een woekering plaats van een kloon van B-cellen die daarmee de normale hematopoëse in het beenmerg verdringt, wat osteolytische laesies, anemie en infecties tot gevolg heeft. Karakteristiek produceert de woekerende B-celkloon een overmaat monoklonale immunoglobulinen waarvan IgG (50%) en IgA (25%) de meest voorkomende zijn. Dit beeld kan tevens gepaard gaan met een overproductie van monoklonale vrije lichte ketens. De grote hoeveelheden circulerende eiwitten kunnen na verloop van tijd neerslaan in de nieren wat een verminderde nierfunctie tot gevolg heeft en uiteindelijk resulteert in het uitscheiden van vrije lichte ketens in de urine.

De eerste beschrijving van vrije lichte ketens in urine stamt uit 1848. In die tijd ontving Henry Bence Jones een urinemonster afkomstig van een patiënt met 'mollities ossium' (zachte botten) waarin hij ongebruikelijke precipitatie constateerde. De substantie bleek oplosbaar bij kamertemperatuur maar precipiteerde bij 60 °C en loste weer op bij het verder verhitten van de urine. Post-mortem werd een gelatineachtige substantie aangetroffen in de botten welke grote kernhoudende cellen bevatte die later geïnterpreteerd zouden worden als myeloomcellen (15). Jaren later verschenen de eerste publicaties waarin de door Bence-Jones beschreven eiwitten geïdentificeerd werden als κ - en λ -lichteketens in urine. Deze eiwitten bleken een sterke associatie te vertonen met toegenomen eiwitconcentraties in het bloed, later geïdentificeerd als zijnde M-proteïne (16-18). Sinds de jaren '60 van de vorige eeuw zijn er diverse methoden ontwikkeld

voor de detectie van monoklonale vrije lichte ketens in urine. In de routinelaboratoriumdiagnostiek wordt thans veelal gebruik gemaakt van eiwit-elektroforese voor de eerste screening op vrije lichte ketens in de urine. Essentieel is daarbij dat gebruik gemaakt wordt van een 24-uursurineverzameling of een eerste ochtendurine, waarbij snelle analyse vooropstaat. Contaminatie van de urine met bacteriën kan tot fout-negatieve resultaten leiden (19). Ook diepgevroren opslag van monsters kan een negatief effect hebben op de eiwitconcentratie (20, 21).

Het al dan niet concentreren van urine voor analyse is tot op heden een punt van de discussie. Het tot 100 maal concentreren van de urine (of tot een concentratie van 30 g/l) kan tot eiwitverlies leiden en kan de analyse van monoklonale vrije lichte ketens bemoeilijken vanwege polymerisering van deze eiwitten (22). Eiwit-elektroforese met gebruik van celluloseacetaatstrips of agarosegels worden in de praktijk het meest toegepast voor de eerste screening op vrije lichte ketens. Deze eiwitten kunnen vervolgens zowel als een scherp begrensde band of als multiple bandjes verschijnen. Dit laatste fenomeen kan verward worden met het voorkomen van β_2 -microglobuline en α_2 -microglobuline bij nierschade en daarmee gepaard gaande tubulaire proteïnurie. Lage concentraties monoklonale vrije lichte ketens worden met deze techniek niet opgemerkt en bij een gerichte verdenking op lichte ketens in de urine dient te allen tijde aanvullend onderzoek plaats te vinden. Thans heeft immunofixatie de voorkeur voor confirmatie en typering van monoklonale vrije lichte ketens in urine na detectie met elektroforese. Fixatie van de eiwitten vindt plaats door gebruik te maken van antisera die zowel vrije als gebonden lichte ketens detecteren. Daarnaast is het essentieel dat de antisera verborgen epitopen van lichte ketens kunnen detecteren (12, 23).

De specialistische immunochemische analysetechnieken voor de detectie van monoklonale vrije lichte ketens in urine verschillen dus aanzienlijk van de reguliere en geautomatiseerde totaaleiwitbepalingen en deze laatste zijn daarom niet geschikt voor de detectie van monoklonale vrije lichte ketens. Toch geeft de werkgroep 'Monoklonale Gammopathie' in 2001 het advies pas bij een totaaleiwitexcretie van meer dan 200 mg/l de immunofixatie naar monoklonale vrije lichte ketens in te zetten (3). Terecht merkt de werkgroep op dat de techniek waarmee het totaal eiwit in urine bepaald wordt in staat moet zijn om monoklonale vrije lichte ketens aan te tonen. Hierbij noemt de richtlijn meer specifiek de 'dye-binding' pyrogallolmethode als geschikte analysetechniek voor het meten van monoklonale vrije lichte ketens in urine. De richtlijn onderbouwt deze aanbevelingen door te refereren aan de artikelen van Keren et al. en van Kyle, gepubliceerd in Arch Pathol Lab Med van 1999 (24, 25). Bestudering van beide publicaties leert dat de auteurs het belang van onderzoek op vrij lichte ketens inderdaad onderkennen. Echter, dit onderzoek naar vrije lichte ketens achten zij alleen noodzakelijk in patiënten met gediagnosticeerde ziekten zoals multiple myeloom, morbus Waldenström, macroglobuline-

mie en amyloïdose. Tevens merken de auteurs op dat de enige geschikte methode voor het onderzoek naar monoklonale vrije lichte ketens in urine immunofixatie van (100 maal) geconcentreerde urine betreft. In beide publicaties wordt het gebruik van totaaleiwitbepalingen (en dipstick) voor het screenen op vrije lichte ketens in urine volledig afgeraden vanwege gebrek aan specificiteit en interferentie van bepaalde geneesmiddelen (24, 25).

Daarnaast geeft de richtlijn aan dat de methode een gevoeligheid moet hebben van 200 mg/l. Deze aanname is gebaseerd op een publicatie van Brigden et al. waarin onderzoek gedaan is naar de optimale urine-collectie voor detectie en monitoren van monoklonale vrijelichteketenproteïnurie (1). De auteurs onderzochten zowel een 24-uursurineverzameling als een random urineportie van 20 patiënten welke bekend waren met een vrijelichteketenproteïnurie. Er werd een totaaleiwitbepaling gedaan op basis van de sulfosalicylzuur assay (Exton's reagent) waarna onderzoek naar monoklonale vrijelichteketens werd ingezet met behulp van een elektroforese (Beckman Paragon). De auteurs vonden dat alle bestudeerde patiënten met een totaaleiwitconcentratie van >200 mg/l ook monoklonale vrije lichte ketens in de urine bleken te hebben wanneer deze bepaald werden met elektroforese. Echter, in 33% (13 van de 40 monsters) van de urinemonsters bleek het onderzoek naar monoklonale vrije lichte ketens in urine met elektroforese positief (aanwezigheid vrije lichte ketens op basis van visuele beoordeling bandjes; dus geen kwantitatieve bepaling van vrije lichte ketens) terwijl de concentratie totaaleiwit minder dan 5 mg/l was. De grens van 200 mg/l bleek daarom niet toepasbaar voor deze groep patiënten. De auteurs geven aan dat dit mogelijk verklaard wordt door de lage sensitiviteit van de sulfosalicylzuurassay. Daarnaast zou een verlate reactiviteit van de sulfosalicylzuurassay voor vrije lichte ketens een rol kunnen spelen. Tevens geven de auteurs aan dat juist de detectie van hele lage concentraties monoklonale vrije lichte ketens essentieel is.

Deze publicatie en onze casus tonen aan dat de grens van 200 mg/l arbitrair gekozen is en geen wetenschappelijk onderbouwde grens voor aanvullend onderzoek. Het verlagen van deze grens kan mogelijk een essentiële bijdrage leveren aan de diagnostiek naar monoklonale gammopathieën, maar gaat gepaard met veel extra praktisch werk en hogere kosten. Een aanpassing van de richtlijn lijkt ons inziens daarom niet op zijn plaats. Goed overleg tussen de klinisch chemicus en clinicus practicus is echter essentieel.

Conclusie

Deze patiëntencasus toont aan dat een lage concentratie eiwit in de urine niet zonder meer een vrijelichteketenproteïnurie uitsluit, hoewel bij deze patiënt duidelijk sprake was van een hematologische maligniteit (tekenen van MGUS in beenmergaspiraet en MDS in beenmergbiopsie). Eigen observatie leert zelfs dat 10% van de urinemonsters waarin monoklonale lichte ketens gevonden werden een totaaleiwitconcentratie van <200 mg/l (gemiddelde concentratie (SD) 98, (44) mg/l) bleek te hebben. Het gebrek aan sensitiviteit en

specificiteit van totaaleiwit bepalingen in urine houdt het risico in dat een positieve uitslag op monoklonale vrije lichte ketens wordt gemist. Zelfs bij een lage verdenking op een hematologische maligniteit en bij afwezigheid van een M-proteïne in het bloed kan de bepaling van monoklonale vrije lichte ketens in de urine gerechtvaardigd zijn.

Literatuur

1. Brigden ML, Neal ED, McNeely MD, et al. The optimum urine collection for the detection and monitoring of Bence Jones proteinuria. *Am J Clin Pathol.* 1990; 93 (5): 689-93.
2. Bataille R, Harousseau JL. Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 1997; 336 (23): 1657-64.
3. Kwaliteitsinstituut voor de gezondheidszorg CBO. Monoklonale gammopathie (paraproteïnemie). Utrecht: CBO; 2001.
4. Waller KV, Ward KM, Mahan JD et al. Current concepts in proteinuria. *Clin Chem.* 1989; 35 (5): 755-65.
5. Kawakami H, Murakami T, Kajii T. Normal values for 24-h urinary protein excretion: total and low molecular weight proteins with a sex related difference. *Clin Nephrol.* 1990; 33 (5): 232-6.
6. Lemann Jr J, Dumas BT. Proteinuria in health and disease assessed by measuring the urinary protein/creatinine ratio. *Clin Chem.* 1987; 33 (2 Pt 1): 297-9.
7. McElderry LA, Tarbit IF, Cassells-Smith AJ. Six methods for urinary protein compared. *Clin Chem.* 1982; 28 (2): 356-60.
8. Hortin GL, Meilinger B. Cross-reactivity of amino acids and other compounds in the biuret reaction: interference with urinary peptide measurements. *Clin Chem.* 2005; 51 (8): 1411-9.
9. Nishi HH, Eln RJ. Three turbidimetric methods for determining total protein compared. *Clin Chem.* 1985; 31 (8): 1377-80.
10. Dube J, Girouard J, Leclerc P. Problems with the estimation of urine protein by automated assays. *Clin Biochem.* 2005; 38: 479-85.
11. Line DE, Adler S, Fraley DS et al. Massive pseudoproteinuria by nafcillin. *JAMA.* 1976; 235: 1259.
12. Graziani M, Merlini G, Petrini C. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. *Clin Chem Lab Med.* 2003; 41 (3): 338-46.
13. Lefèvre G, Bloch S, Le Bricon T et al. Influence of protein composition on total urinary protein determined by Pyrocatechol-Violet (UPRO Vitros) and pyrogallol red dye binding methods. *J Clin Lab Anal.* 2001; 15: 40-2.
14. Orsonneau JL, Douet P, Massoubre C et al. An improved pyrogallol Red-Molybdate method for determining total urinary protein. *Clin Chem.* 1989; 35 (11): 2233-6.
15. Jones HB. On a new substance occurring in the urine of a patient with 'mollities ossium'. *Phil Trans Royal Soc London.* 1848; 55-62.
16. Bayne-Jones S, Wilson DW. Immunological reactions of Bence-Jones proteins. II. Difference between the Bence-Jones proteins from various sources. *Bull. John Hopkins Hosp.* 1922; 33: 119-25.
17. Korngold L, Lipari R. Multiple-myeloma proteins. III. The antigenic relationship of Bence Jones proteins to normal gammaglobulin and multiple-myeloma serum proteins. *Cancer.* 1956; 9: 262-72.
18. Edelman GM, Gally JA. The nature of Bence-Jones proteins: chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal γ -globulins. *J Exp Med.* 1962; 116: 207-27.
19. Pezzoli A, Pascali E. Urine collection for the detection of Bence Jones proteinuria. *Am J Clin Pathol.* 1991; 95 (2): 266-8.
20. Klasen IS, Reichert LJ, de Kat Angelino CM, et al. Quantitative determination of low and high molecular weight proteins in human urine: influence of temperature and storage time. *Clin Chem.* 1999; 45 (3): 430-2.
21. Brinkman JW, de Zeeuw D, Duker JJ, et al. Falsely low urinary albumin concentrations after prolonged frozen storage of urine samples. *Clin Chem.* 2005; 51 (11): 2181-3.
22. Levinson SS, Keren DF. Free light chains of immunoglobulins: clinical laboratory analysis. *Clin Chem.* 1994; 40 (10): 1869-78.
23. Bradwell AR, Carr-Smith HD, Mead GP. Highly sensitive, automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin Chem.* 2001; 47 (4): 673-80.
24. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, et al. Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med.* 1999; 123: 106-7.
25. Kyle RA. Sequence of testing for monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med.* 1999; 123: 114-8.

Summary

Brinkman JW, Ijpelaar DHT, Schrandt-van der Meer AM, Jonkers GJPM, Beijer C. Is the lack of sensitivity and specificity of the assay for total protein in urine the reason for missing monoclonal gammopathy? Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2011; 36: 11-15.

Clinical laboratories play an essential role in the study of monoclonal gammopathies. Because of the complexity, guidelines have been published containing recommendations on implementation and interpretation of this laboratory investigation. In The Netherlands, the CBO (Dutch Institute for Healthcare Improvement) guideline 'Monoclonal Gammopathy' with recommendations on screening and follow-up research for paraproteins in both serum and urine is often used. Although this guideline is practical for most cases it is not for our case. Specifically, the CBO guideline recommends analysis of monoclonal free light chains in urine when the concentration of total protein in urine is above 200 mg/L. However, the currently used total protein assays in urine reportedly appear neither sensitive nor specific enough, missing the diagnosis; in agreement with classical findings of Brigden et al. (1990).