

## Atransferrinemie door aanwezigheid van een IgM M-proteïne

H.K. de WOLF, J. van der STAPPEN en J.M.W. van den OUWELAND

M-proteïnes zijn monoklonale immunoglobulines of fragmenten ervan en kunnen in een hoge concentratie in bloedmonsters voorkomen. De aanwezigheid van M-proteïnes kan aanleiding geven tot rapportage van foutieve uitslagen van verschillende geautomatiseerde klinisch chemische testen (1). Verschillende mechanismen liggen hieraan ten grondslag. Veelal treedt precipitatie van het M-proteïne zelf op door suboptimale omstandigheden gedurende de reactiefase van het monster. Ook kan precipitatie optreden van een complex van het M-proteïne met een bestanddeel aanwezig in het reactiemedium (1, 2). Eiwitprecipitatie leidt in beide gevallen tot turbiditeit, leidend tot vals-verlaagde of vals-verhoogde uitslagen. Testen waarbij een dergelijk fenomeen gerapporteerd is zijn onder andere bilirubine, HDL-cholesterol en ijzer (2, 3). Een ander mechanisme waardoor M-proteïnes kunnen interfereren met analyses is de binding van het M-proteïne aan het te bepalen eiwit of aan een van de testcomponenten. Binding leidt niet tot precipitatie maar interfereert wel met de reactie. Een dergelijk fenomeen leidt veelal tot vals-negatieve resultaten en kan optreden in immunoassays (1). Interferentie door een M-proteïne kan op een aantal manieren aannemelijk gemaakt worden. Eiwitprecipitatie is waarschijnlijk te maken door bestudering van de reactiekinetiek van de bepaling (1, 3). Incubatie van het monster met polyethyleenglycol (PEG) leidt tot precipitatie van het M-proteïne. Een sterk verhoogde uitslag na PEG-precipitatie is indicatief voor de aanwezigheid van een poly- of monoklonaal aanwezig immunoglobuline. Tenslotte kan een verhoogde lipemische index (L-index) een indicatie zijn voor een M-proteïne (4). De turbiditeit die optreedt ten gevolge van de vroegtijdig optredende eiwitprecipitatie leidt in dat geval tot een vals-verhoogde L-index. We presenteren een casus van een patiënte met een onwaarschijnlijk laag transferrine, suspect voor storing door een M-proteïne.

### Materiaal en methoden

Een 62-jarige patiënte werd poliklinisch gezien wegens een normocytair anemie. Uit het heparine plasma werd onder andere transferrine, ijzer en ferritine bepaald en uit het EDTA bloed hemoglobine, MCV en bezinking. Analyse van de ijzerhuishouding vond plaats op een geautomatiseerde immunochemie analyser (Roche, Modular).

*Klinisch Chemisch laboratorium, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen*

E-mail: h.d.wolf@cwz.nl

Vervolgonderzoek van het transferrine bestond uit 1) immunochemische analyse na incubatie met PEG, 2) bepaling met een andere immunochemische analyse-methode (Abbott, Architect) en 3) kwantificering met behulp van een chromatografische methode. PEG-precipitatie vond plaats door incubatie van het monster met een 25% PEG6000-oplossing, gevolgd door centrifugatie en heranalyse van het supernatant. De transferrinewaarde werd gecorrigeerd voor de verkregen verdunning (1x). De transferrinewaarde kon chromatografisch vastgesteld worden, gebruikmakend van de bepaling van carbohydraat deficiënt transferrine (CDT) (5).

Hiertoe werd een ijklijn over een concentratiegebied van 12 tot 41  $\mu\text{mol/l}$  gemaakt met op de X-as de gesommeerde waarde van alle sialofracties van 21 willekeurige monsters. Op de Y-as werd vervolgens de transferrinewaarde van dezelfde monsters uitgezet, zoals deze immunochemisch waren gemeten (Roche, Modular). De transferrinewaarde van betreffend plasmonster werd vervolgens vastgesteld door de CDT-waarde van dit monster via de ijklijn te extrapoleren naar de bijbehorende immunochemische waarde. M-proteïne diagnostiek vond plaats met behulp van gelelektroforese, de analyse van de bezinking middels een StaRRsed analyser.

De lipemische index is onderdeel van de serum indices en vond geautomatiseerd plaats op de Roche Modular via een formule waarbij de absorptie van het monster bij verschillende golflengten en op verschillende tijdstippen als input dient. Ook de registratie van de reactiekinetiek gebeurt geautomatiseerd op de Roche Modular, waarbij de absorptie van de reactiecuveet wordt vastgelegd op een dertigtal tijdstippen verspreid over de duur van de reactie, vanaf het moment van pipetteren van het monster via de eerste en tweede reactiefase tot het moment van aflezen van de reactie.

### Resultaten en discussie

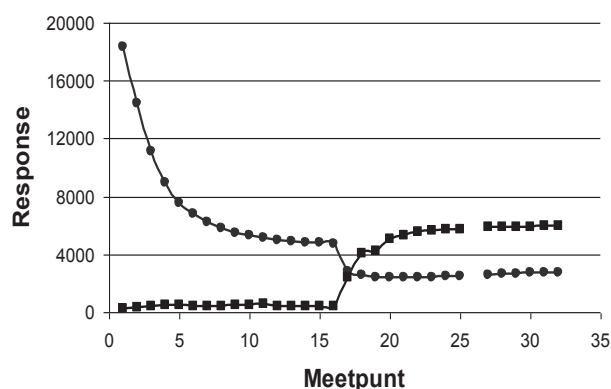
De patiëntresultaten staan weergegeven in tabel 1. Er bleek sprake van een normocytair anemie met een sterk verhoogde bezinking, een sterk verlaagde transferrinewaarde van 2  $\mu\text{mol/l}$  en een bijbehorend onwaarschijnlijke ijzerverzadiging. Herhaaldelijke analyse gaf dezelfde resultaten. De reactiecurve van de transferrinebepaling toonde een sterk afwijkende kinetiek met een sterk verhoogde initiële absorptie die gedurende de eerste en tweede fase van de reactie afnam (figuur 1). Een dergelijke reactiekinetiek is indicatief voor interferentie van de meting door het optreden van eiwitprecipitatie in de vroege reactiefase (1).

**Tabel 1.** Laboratoriumwaarden casus

	Casus	Referentie
Transferrine		22-40 µmol/l
Immunochemisch initieel (Roche Modular)	2	
Immunochemisch (na PEG-precipitatie)	14	
Immunochemisch vervolg (Abbott Architect)	20	
Chromatografisch	20	
IJzer	6	10-30 µmol/l
Verzadiging	150	15-50 %
Ferritine	94	20-400 µmol/l
Hemoglobine	4,8	7,5-10 mmol/l
MCV	87	80-100 fl
Bezinking	> 140	1-29 mm/uur

De lipemische index van het plasma was niet afwijkend (220 mg/l, referentie < 1000). Dit is opvallend gezien de hoge absorptie in de reactiecurve. Mogelijk is deze discrepantie te wijten aan verschillen in fysisch chemische omstandigheden gedurende de beide analyses. M-proteïne diagnostiek toonde een M-proteïne aan in een hoge concentratie van circa 42 g/l (type IgM).

Transferrine werd op drie verschillende manieren herbepaald (tabel 1). Immunochemische analyse na PEG-precipitatie gaf een waarde van 14 µmol/l. Heranalyse van de transferrinebepaling op een andere immunochemie analyser en middels chromatografie leverde beide een waarde van 20 µmol/l. De laatste waarde werd als correct beschouwd en aan de kliniek doorgegeven. De ijklijn die chromatografisch werd gemaakt aan de hand van de CDT-bepaling had een hoge mate van correlatie ( $r^2 = 0,99$ ). PEG-precipitatie is analytisch niet zuiver en kan slechts gebruikt worden als een grove schatting van de werkelijke waarde. Chromatografische analyse van de transferrine op basis van de CDT-bepaling blijkt een bruikbaar alternatief in geval van immunochemische interferentie, gezien de vergelijkbare uitslag van de Architect. De bevindingen bevestigden het vermoeden van interferentie van de transferrinebepaling door de M-proteïne. Zover ons bekend is storing van de bepaling van transferrine door M-proteïnes enkel in een Franstalige publicatie beschreven (6).

**Figuur 1.** Reactiecurve transferrine casus (rond) en representatief sample (vierkant)

### Conclusie

Ook de analyse van transferrine kan gestoord zijn door de aanwezigheid van een M-proteïne. Bij een onverwacht lage transferrineconcentratie dient men hierop alert te zijn. Chromatografische analyse van de transferrine is in deze gevallen een bruikbaar alternatief.

### Dankbetuiging

Dank aan Twan Beijers en Henny van Daal voor analytische assistentie.

### Referenties

1. Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45: 1240-1243.
2. Berth M, DeLanghe J. Protein precipitation as a possible important pitfall in the clinical chemistry analysis of blood samples containing monoclonal immunoglobins. *Acta Clin Belg.* 2004; 59: 263-273.
3. Yang Y, Howanitz PJ, Howanitz JH, Gorfajin H, Wong K. Paraproteins are a common cause of interferences with automated chemistry methods. *Arch Pathol Lab Med.* 2008; 132: 217-223.
4. Munnix ICA, Raijmakers MTM, Oosterhuis WP, Kleinveld HA. Detection of a monoclonal gammopathy by lipemia-index measurement. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk.* 2009; 34: 248-249.
5. Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem.* 2003; 49: 1881-1890.
6. Roszyk L, Faye B, Tournilhac O, Fogli A, Sapin V. Perturbation de la détermination immunoturbidimétrique de la ferritine et de la transferrine due à la présence d'une IgM monoclonale. *Ann Biol Clin.* 2007; 65: 659-662.