

Christof Schild¹, Florence Egger¹, Jean-Marc Nuoffer¹

Diagnostik monoklonaler Gammopathien: Analytische Fallstricke und Interferenzen

Monoklonales Immunglobulin (M-Protein) kann Analysen beeinträchtigen oder Laborresultate verfälschen. Die Interferenzen können die Analytik der M-Proteine selbst, aber auch andere Analysen betreffen.

Interferenzen beim Nachweis von M-Proteinen

Die **Immundefixation** erlaubt, einige Interferenzen direkt zu erkennen. Ein Antigen-Überschuss kann an den typischen zentral entfärbten Banden erkannt werden. Dies kann durch einen verdünnten Ansatz korrigiert werden. Präzipitierte Immunglobuline (z.B. Kryoglobuline) können durch Präzipitate im Bereich der Auftragstellen erkennbar sein. Nach Solubilisierung mit Fluidil/Mercaptoethanol ist die Immundefixation interpretierbar. Kryoglobuline können aber bereits präanalytisch ausfallen, wenn die Probe nicht konstant bei 37 °C gehalten wird. Dies kann zu falsch negativer Immundefixation und Serum-Proteinelektrophorese wie auch falsch tiefen immunologisch bestimmten Immunglobulinen führen. In der **Kapillaronenelektrophorese** können Medikamente, die im UV-Bereich absorbieren, Extragradien verursachen [1]. Diese sind als Artefakte erkennbar, da sie in der Immundefixation keinen M-Gradienten verursachen. Als seltenen Fall fanden wir ein hochkonzentriertes M-Protein (34 g/l), das durch die Kapillaronenelektrophorese nicht erfasst wurde, weil es im alkalischen Elektrophorese-Puffer präzipitierte [2]. Ersten Hinweis lieferte die Diskrepanz zwischen dem hohen Gesamt-Protein von 104 g/l und normaler Elektrophorese. Für die densitometrische Quantifizierung von M-Gradienten empfehlen wir die Tangenten-Methode [3], da diese nicht anfällig ist auf Interferenzen durch polyklonales Immunglobulin.

Die individuellen Eigenschaften der M-Proteine jedes Patienten stellen eine besondere Herausforderung an die Analytik. So muss ein Assay für freie Leichtketten im Serum (sFLC) die polyklonalen sowie monoklonalen sFLC jedes Patienten erkennen. Dabei können bei individuellen Leichtketten Epitope verdeckt oder verändert sein oder ganz fehlen. Freelite sFLC-Assays (BindingSite) enthalten polyklonales Antiserum, N-Latex-Assays (Siemens) dagegen zwei monoklonale Antikörper. Der Freelite Assay scheint dank dem polyklonalen Antiserum eine leicht höhere Sensitivität für monoklonale Leichtketten aufzuweisen [4–7].

Antigen-Überschuss kann bei nephelometrischer/turbidimetrischer Quantifizierung von Immunglobulinen [8] und sFLC [9–11] zu massiv falsch tiefen Resultaten führen. Vorteilhaft sind sFLC-Assays mit automatisiertem Antigen Excess Check [12], dieser kann jedoch selten auch versagen (Abb. 1). Ringversuchsserum gemessen auf Roche Integra zeigte ein grenzwertig normales Kappa-Lambda-Ratio von 0,28 (Referenzbereich 0,26–1,65) bei erhöhten sFLC Lambda von 82 mg/l. Dies war nicht vereinbar mit der Serum-Immundefixation, die monoklonale Leichtketten vom Typ Lambda zeigte. Nach manueller Vorverdünnung wurde sFLC Lambda von 2700 mg/l gemessen. Der Antigen-Exzess wurde von der Mehrheit des Roche-Kollektives nicht erkannt, den zugehörigen Ringversuch bestanden wir erst nach Intervention beim Ringversuchszentrum.

sFLC-Verlaufsbeurteilung: Die Myeloma Working Group empfiehlt einen Anstieg respektive Abfall der involvierten sFLC von 50% als Progression respektive Response zu werten [13]. In

Diagnostic des gammopathies monoclonales: écueils et interférences analytiques

La présence d'une immunoglobuline monoclonale (protéine M) dans les échantillons des patients peut parfois perturber les analyses de laboratoire et les résultats. Les interférences peuvent directement concerner l'analyse de la protéine M, mais d'autres méthodes peuvent également être perturbées. Dans la littérature, la précipitation des protéines M ou la turbidité accrue du mélange réactionnel liée aux protéines M sont les causes les plus fréquemment mentionnées d'interférences liées aux protéines M. L'exemple de l'essai circulaire montre que les interférences passent le plus souvent inaperçues dans les laboratoires, même si elles seraient décelables au moyen d'analyses concomitantes. Cet article décrit les mécanismes pouvant causer des interférences liées aux protéines M et présente quelques méthodes permettant de démasquer ces interférences.

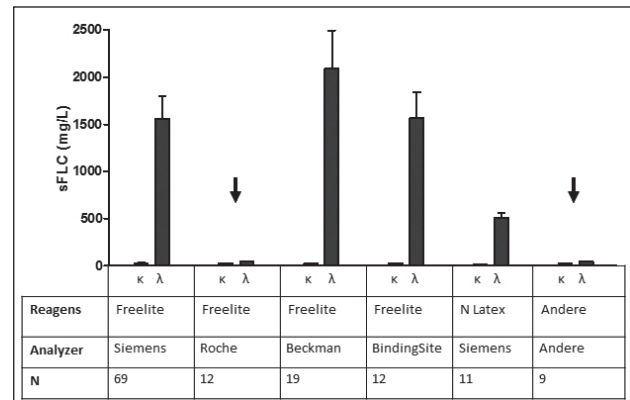


Abbildung 1: Ringversuch Instand 2012-6. Falsch tiefe Werte durch Antigen-Überschuss in der Roche-Gruppe sowie bei der Gruppe «andere» Methoden».

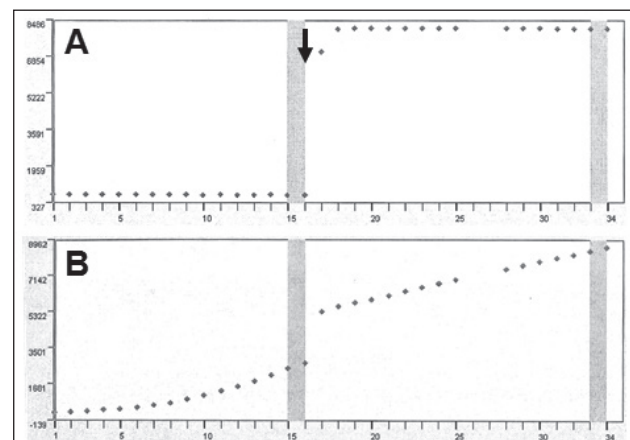


Abbildung 2: Reaktionskinetik der Phosphat-Bestimmung auf Roche Modular A: Kontrollplasma mit 2,3 mM Phosphat: Absorption bei 340 nm steigt nach Zugabe von Ammonium-Molybdat an (Pfeil). B: Plasma des Patienten. M-Protein fällt im sauren Reaktionsansatz aus. Falsch hohe Phosphatmessung durch stetig ansteigende Trübung.

¹ Dr. Christof Schild, Florence Egger und PD Dr. Jean-Marc Nuoffer, Universitätsinstitut für Klinische Chemie, Inselspital Universitäts-spital Bern, Universität Bern

Anbetracht der publizierten Interlot-Variationskoeffizienten des Freelite Assays von 6–45% [4, 14–16] sowie der hohen biologischen Variationskoeffizienten der sFLC von 28% bei Patienten mit klinisch stabiler monoklonaler Gammopathie [17] bieten die Cutoffs für Progression und Regression wenig statistische Sicherheit.

Interferenzen durch M-Proteine können die verschiedensten Analysen beeinträchtigen

Präzipitation von M-Proteinen oder erhöhte Trübung im Reaktionsansatz können Interferenzen verursachen [18]. Anfällig sind insbesondere Analysen mit photometrischer oder turbidimetrischer/nephelometrischer Detektion. Je nachdem, zu welchem Zeitpunkt in der Reaktionskinetik das M-Protein ausfällt, sind sowohl falsch hohe wie auch falsch tiefe Werte möglich [19].

Eine sehr hohe Phosphat-Bestimmung aus unserem Labor war nicht verein-

bar mit der Klinik der Patientin. Eine Ursache dafür kann die Pseudohyperphosphatämie sein, wenn hochkonzentrierte Immunglobuline im sauren Assaypuffer ausfallen und falschhohe Phosphatkonzentrationen vortäuschen [20,21]. Im Anschluss fand sich bei der Patientin ein monoklonales IgG Lambda (48 g/l). Die Reaktionskinetik der Phosphatbestimmung zeigte Hinweise auf Pseudohyperphosphatämie (Abbildung 2). Bestätigung erfolgte durch Subtraktion von IgG (Protein-G-Sepharose) vor Analyse und Überprüfung der Verdünnungslinearität [20].

Folgende Methoden können helfen, eine vermutete Interferenz durch Trübung zu bestätigen: Messung der Verdünnungslinearität, Entfernung des M-Proteins vor Analyse z.B. durch Polyethylenglykol-Fällung oder Ultrafiltration [18]. Wird ein falschtiefes Resultat vermutet, kann das betreffende Serum mit einer hohen Kontrolle gespikt und die Wiederfindung ermittelt werden. Unabhängig bei allen genannten

Methoden ist das Mitführen einer Kontrolle, die analog behandelt wird und dabei keine abweichenden Resultate zeigen darf.

Bei Patienten mit monoklonaler Gammopathie kann die **Viskosität** des Serums oder Plasmas erhöht sein, insbesondere auch bei Kryoglobulinen. Aspiriert der Analyzer dadurch zu wenig Probe, kann dies zu falsch tiefen Resultaten führen [18,22,23].

Hyperkalzämie ist eine häufige Komplikation beim Multiplen Myelom. In seltenen Fällen liegt aber eine Pseudohyperkalzämie vor, bedingt durch Bindung von Kalzium an ein M-Protein. In diesen Fällen ist nur das Gesamtkalzium erhöht, nicht jedoch das ionisierte Kalzium [24–26].

Pseudohyponaträmie ist eine Interferenz, die bei Proben mit Hyperproteinämie und Hyperlipidämie auftreten kann, wenn Natrium mittels indirekter ionenselektiver Methode oder flammenphotometrischen Methode gemessen wird [27,28,18]. Die gemess-



**Service für Ihre Praxis,
der weit über Analyse-
Resultate hinausgeht.
Ihr regionales Labor mit
schweizweit vernetzter
Kompetenz**

 **medisupport**

SCHWEIZER NETZWERK REGIONALER LABORATORIEN

Alpenquai 28a • 6005 Luzern
Tel. +41 41 417 10 80
infode@medisupport.ch
• www.medisupport.ch •

Medisupport in der Deutschschweiz

• bioanalytica • bioexam • genesupport •
• mcl • ortho-analytic • toggweiler •



sene Plasmaosmolarität liegt im Referenzbereich [29]. Bei Verdacht auf Pseudohyponatriämie wird empfohlen, die Analyse mittels direkter ionenselektiver Methode zu wiederholen [18]. Bindungen von M-Proteinen an Assay-Bestandteile sind seltene Ursachen von Interferenzen, analog zu heterophilen Antikörpern [30, 31]. Bindet ein M-Protein an den Analyten, kann dies nebst der analytischen Interferenz auch physiologische Konsequenzen haben. So

verursachte ein Insulin-bindendes M-Protein bei einem Patienten Hypoglykämie durch verzögerte Insulin-Clearance [32].

Mögliche Einflussfaktoren, welche bestimmen ob es zu Interferenzen kommt, sind: Konzentration des M-Proteins, Affinität, Fähigkeit zur Polymerisation sowie Löslichkeit in Abhängigkeit von Temperatur, pH und Ionenstärke.

Zusammenfassend können M-Proteine Analysen im Labor über verschiedene

Mechanismen stören. Das Ringversuchsbeispiel zeigt uns, dass die Interferenzen in Laboratorien mehrheitlich übersehen werden, selbst wenn sie durch begleitende Analysen erkennbar wären.

Korrespondenz:
Christof.Schild@insel.ch

Referenzen

Online unter: www.sulm.ch/d/pipette → Aktuelle Ausgabe (Nr. 1-2016).

Luca Bernasconi¹, Esther Mundwiler¹

Monoklonale Gammopathien

Neue IMWG-Kriterien und Labortests für die Diagnose, Prognose und Verlaufskontrolle des Multiplen Myeloms

Die kürzlich aktualisierten Kriterien für die Diagnose des Multiplen Myeloms erlauben anhand sogenannter Malignitäts-Biomarker «Hochrisiko»-Patienten vor dem Erscheinen der Symptome zu identifizieren und therapieren. Die neuen Richtlinien berücksichtigen labortechnische Fortschritte, insbesondere die Bestimmung der freien Leichtketten und deren Quotient. Neue Labortests liefern zusätzlich prognostisch wertvolle Informationen und sollten für die Verlaufskontrolle in speziellen klinischen Situationen den klassischen Methoden vorgezogen werden.

Neue Diagnosekriterien für das Multiple Myelom

Im 2014 wurden aktualisierte Kriterien für die Diagnose des Multiplen Myeloms (MM) von der International Myeloma Working Group (IMWG) veröffentlicht [1]. Diese machen einen Paradigmenwechsel bezüglich Definition und Management dieser Erkrankung geltend. Die früheren Kriterien (2003) verlangten die Anwesenheit einer Endorganschädigung für die Diagnose des MM; d.h. Patienten mussten eine oder mehrere der sogenannten «CRAB»-Kriterien aufweisen: Hyperkalzämie (Calcium), Niereninsuffizienz (Renal), Anämie (Anemia) und/oder osteolytische Läsionen (Bone). Besonders problematisch bei dieser Voraussetzung war, speziell im Fall des sogenannten «Smouldering» Multiplen Myeloms (SMM), dass die Behandlung der Patienten erst begonnen werden konnte, nachdem der Schaden – oft schwer und potentiell irreversibel – bereits

angerichtet worden war. Dies konnte in einer Ära mit limitierten Behandlungsoptionen und signifikanten Nebenwirkungen akzeptiert werden, jedoch kann dies in Hinsicht auf die neuen, verbesserten Therapien nicht mehr gerechtfertigt werden. Insbesondere nicht, da aktuelle Studien beweisen, dass «Hochrisiko»-SMM-Patienten von einer frühzeitigen Therapie profitieren können [2].

Die neuen IMWG-Kriterien erlauben anhand von Frühindikatoren (sog. Malignitäts-Biomakern) eine Diagnose des MM, bevor die CRAB-Symptome auftreten. Zusätzlich zu den bekannten CRAB-Symptomen schliessen die revidierten IMWG-Kriterien folgende drei Marker als «Myelom-definierende Ereignisse» ein:

1. $\geq 60\%$ klonale Plasmazellen im Knochenmark;
2. ein Verhältnis (involvierter/nicht-involvierter) freier Leichtketten im Serum >100 (vorausgesetzt, dass die Konzentration der involvierten FLC mindestens 100 mg/l beträgt);
3. mehr als eine fokale Knochenläsion im MRT.

Bemerkenswerterweise wurde der Nachweis eines M-Proteins im Serum und/oder Urin in den neuen IMWG-Kriterien nicht mehr aufgenommen. Allerdings stellte dieses Kriterium schon in der früheren Fassung keine «sine qua non»-Bedingung dar, um die Diagnose der sogenannten «nicht-sezernierenden MM» (ca. 3% aller MM-Fälle) zu gewährleisten. Eine Zusammenfassung der neuen diagnostischen Kriterien für das MM befindet sich in Tabelle 1.

Labordiagnostik monoklonaler Gammopathien

Die Einführung der nephelometrischen Quantifizierung der freien Leichtketten (FLC) im Serum vor fast 15 Jahren, zusätzlich zu der gut etablierten Serumprotein- (SPE) und Immunfixationselektrophorese (IFE), hat die Abklärungsstrategien für monoklonale Gammopathien drastisch verändert. In einer Studie der Mayo Clinic aus dem Jahr 2009 untersuchten Katzmann und Kollegen die Sensitivität unterschiedlicher Methodenkombinationen zum Nachweis von monoklonalen Gammopathien [3]. →

¹ Dr. sc. nat. Luca Bernasconi, Esther Mundwiler, Institut für Labormedizin, Kantonsspital Aarau