

# Immunfixations-Elektrophorese (IFE) zum Screening auf Bence Jones-Proteinurie

## Screening of Bence Jones Proteinuria by Immunofixation-Electrophoresis

Maren Messinger, Lothar Thomas

Zentrallabor Krankenhaus Nordwest, Frankfurt/Main

### Zusammenfassung:

Zum Screening auf Bence Jones-Proteinurie wird die Immunfixations-Elektrophorese (IFE) des unkonzentrierten Harnes empfohlen. Aufgrund einer Nachweisempfindlichkeit für freie Leichtketten zwischen 9 und 65 mg/l werden die klinisch relevanten Bence Jones-Proteinurien erfaßt.

Der VK-Wert der Intraassay-Präzision der IFE zum Bence Jones-Proteinnachweis beträgt 12%, derjenige der Interassay-Präzision 30%.

Mit der Ausbildung eines Zonenphänomens in der IFE beim Screening auf Bence Jones-Proteinurie muß gerechnet werden, wenn die Bence Jones-Proteinausscheidung vom Kappa-Typ über 1,4 g/l und vom Lambda-Typ über 0,7 g/l beträgt.

Die Konzentrationsbestimmung von Bence Jones-Protein sollte mit der Biuret-Methode erfolgen. Mit der Coomassie Brilliant Blau G 250-Methode wird Bence Jones-Protein nur in sehr unterschiedlichem Ausmaß erfaßt.

### Schlüsselwörter:

Bence Jones-Proteinurie – Immunfixations-Elektrophorese – Proteinbestimmung – Screening

### Summary:

For screening of Bence Jones (BJ) proteinuria the immunofixation electrophoresis (IFE) of non concentrated urine samples are recommended. By the proposed method clinical significant BJ proteinuria are detected because the analytical sensitivity of the IFE is between 9 and 65 mg/l for free light chains.

The intraassay variability of IFE for determination of BJP is 12% the interassay variability 30%.

At kappa light chain levels higher than 1.4 g/l and lambda levels higher than 0.7 g/l the IFE might be associated with problems related to interpretation caused by antigen excess phenomena.

For determination of total protein in BJP containing urine samples the Biuret method is superior to the Coomassie Brilliant Blue G 250 method. The comparison of both methods revealed that BJ-proteinuria delivered variant results with the Coomassie Brilliant Blue G 250 method.

### Keywords:

Bence Jones (BJ) proteinuria – immunofixation electrophoresis – total urinary protein – screening

## Einleitung

Bence Jones-Proteine (BJP) sind monoklonal synthetisierte Leichtketten und treten bei malignen Erkrankungen des B-Zellsystems auf. Gewöhnlich liegt ein multiples Myelom vor oder eine andere immunproliferative Erkrankung wie z. B. eine chronisch lymphatische Leukämie, ein malignes Non-Hodgkin-Lymphom, die Haarzelleukämie, eine monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz oder nur eine transiente Bence Jones-Proteinurie (1).

Zum empfindlichen Nachweis der Bence Jones-Proteinurie, d. h. von Ausscheidungen unter 200 mg/24 Std., werden seit einigen Jahren neben der Immunfixations-Elektrophorese (IFE) (2) Enzym- und Radioimmunoassays (3, 4) und immunnephelometrische Methoden (5, 6) angewendet. Während die Enzym- und Radioimmunoassays kommerziell nicht verfügbar sind, haben die immun-

nephelometrischen Methoden den Nachteil, daß durch die Anwendung von Antisera gegen gebundene Leichtketten nur auf Umwegen die Bestimmung von BJP ohne die gleichzeitige Erfassung von intakten Immunglobulinen möglich ist (5, 6). Die Immunfixations-Elektrophorese erscheint deshalb vielen Laboratorien für die Routinediagnostik als die praktikabelste Methode.

Obwohl schon Publikationen zum BJP-Nachweis durch die Immunfixations-Elektrophorese, insbesondere beziehungsweise auf die Spezifität dieser Methode, vorliegen (2, 7), existieren nur wenige Angaben zur Zuverlässigkeit. Aus diesem Grunde untersuchten wir

- die Impräzision der Immunfixations-Elektrophorese zum Nachweis von BJP im Harn,
- die Nachweisempfindlichkeit dieser Methode für BJP im Harn, und
- die Ausbildung des Zonenphänomens in Abhängigkeit vom Ausmaß der BJP-Ausscheidung, eine Problemstel-

lung, die zu Interpretationsschwierigkeiten und sogar falsch negativen Befunden beim Screening des Harnes auf BJP führen kann.

Ein wichtiges Kriterium zur quantitativen Erfassung einer Bence Jones-Proteinausscheidung ist die Wahl der Proteinbestimmungsmethode.

In der Literatur sind für die Bestimmung von BJP sowohl die Biuret-Methode (8) als auch die Coomassie Brilliant Blau G-250-Methode (9) angegeben. Wir haben beide Methoden an Harnproben, an denen BJP den überwiegenden Proteinanteil ausmachte, miteinander verglichen.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß BJP im unkonzentrierten Harn empfindlich mit der IFE nachgewiesen werden kann und zur Proteinbestimmung die Biuret-Methode gut geeignet ist.

## Material und Methoden

Alle Harnproben lagen nativ, d. h. als nicht ankonzentriertes Untersuchungsgut vor und waren zuvor, mittels Urineiweiß- und Immunfixations-Elektrophorese, als relativ reine BJP-Harne mit einem elektrophoretischen BJP-Anteil von  $\geq 70\%$  ermittelt worden. Die IFE wurde nach der unter Lit. (2) angegebenen Arbeitsvorschrift durchgeführt. Zum Einsatz gelangten monospezifische polyklonale Antiseren, Anti-Human-Ig/L-Kette Typ Kappa bzw. Lambda und Anti-Human-Ig/freie L-Kette Typ Kappa bzw. Lambda sowie Antiseren gegen Ig/ $\alpha$ -Kette, Ig/ $\mu$ -Kette, Ig/ $\gamma$ -Kette der Behringwerke/Marburg.

### *Impräzision der Immunfixations-Elektrophorese*

Untersucht wurden die Intraassay- ( $n = 8$ ) und Interassay-Präzision ( $n = 10$ ) von BJP-haltigen Harnen mit der IFE unter Verwendung der Antiseren Anti-Human-Ig/L-Kette Typ Kappa und Lambda anhand von BJP-Harnen vom Typ Kappa und Lambda. Die quantitative Auswertung der Immunpräzipitate erfolgte durch Densitometrie (Elscrip 3, Fa. Hirschmann) und anschließender Planimetrie (Planimeter der Fa. Ott).

### *Analytische Sensitivität der Immunfixations-Elektrophorese*

Mittels der Biuret-Methode, bezugnehmend auf Rinderserumalbumin als Referenzprotein, wurde die Gesamteiweiß-Konzentration der BJP-haltigen Harnproben ermittelt und über den relativen Kurvenanteil der Urineiweiß-Elektrophorese die entsprechende BJP-Konzentration berechnet. Die Harne wurden dann mit physiologischer Kochsalzlösung in verschiedenen Stufen bis zu einer BJP-Konzentration von 5 mg/l verdünnt.

Die Auswertung erfolgte für BJP-Harne vom Typ Kappa bzw. Lambda durch optische Beschreibung der Immunpräzipitate vor weißem Hintergrund, in Form der minimal detektierbaren Konzentration (MDK). Die MDK entspricht der BJP-Konzentration, die zwei unabhängige Betrachter in der IFE gerade noch als Immunpräzipitat vor weißem Hintergrund erkennen konnten.

### *Untersuchung des Zonenphänomens*

Das Zonenphänomen tritt in der IFE bei vorgegebener Antikörperkonzentration auf, wenn die BJP-Konzentration den Äquivalenzbereich überschreitet. Da die BJP-Ausscheidung im Harn im Bereich von wenigen mg/l bis mehreren g/l liegen kann, ist das Auftreten eines Zonenphänomens nicht selten. Unter Verwendung von Harnen

unterschiedlicher BJP-Konzentration wurde deshalb beurteilt, wie sich ein Zonenphänomen darstellt und bei welcher BJP-Konzentration es sich in unserem IFE-System einstellt.

### *Vergleich zweier Proteinbestimmungs-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Bence Jones-Protein*

Die Durchführung der Biuret-Methode erfolgte mit dem Merckotest Gesamteiweiß nach der Arbeitsvorschrift der Fa. Merck (10).

Für die Coomassie-Methode wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G 250 der Fa. Serva verwendet und nach der Vorschrift von Bradford (11) gearbeitet. Beiden Methoden diente als Referenzprotein Rinderserumalbumin (12).

19 Harnproben, von 7 Probanden stammend, wurden vergleichend mit beiden Proteinbestimmungs-Methoden untersucht. 3 Harnproben enthielten den Leichtkettentyp Kappa und 4 Proben den Typ Lambda.

## Ergebnisse

### *Beurteilung der Immunfixations-Elektrophorese auf BJP*

Die Ausscheidung von Immunprotein im Harn führt zur Ausbildung von Immunpräzipitaten in der IFE. Besteht eine Ausscheidung von intakten, monoklonalen synthetisierten Immunglobulinen, zeigt die IFE mit dem entsprechenden Schwereketten-Antiserum ein monoklonales bandenförmiges Immunpräzipitat. In gleicher Höhe dieser Bande erscheint im Bereich der Leichtketten-Präzipitation eine dazu korrespondierende Bande, die die Typisierung des monoklonalen Immunpräzipitates gestattet.

Isolierte Leichtketten eines Typs zeigen keine Präzipitation mit Schwereketten-Antiseren. Sie lassen sich direkt, durch Antiseren gegen freie Leichtketten (Anti-Human-Ig/freie L-Kette) und indirekt durch ein Ausschlußverfahren nachweisen. Vermittels des Ausschlußverfahrens werden freie Leichtketten durch die kombinierte Anwendung von Antiseren gegen Schwereketten und gebundene Leichtketten (Anti-Human-Ig/L-Kette) nachgewiesen. Liegt eine monoklonale Bande im Bereich der Leichtketten-Präzipitate vor, der keine korrespondierende Bande im Schwerekettenbereich gegenübersteht, handelt es sich um den Nachweis von freien Leichtketten (Abb. 1).

Isolierte Schwereketten einer Klasse zeigen keine Präzipitation mit Leichtketten-Antiseren. Das Immunpräzipitationsmuster weist im Fall einer isolierten Schwerekettenausscheidung eine monoklonale Bande im Bereich der Schwerekettenpräzipitate auf, der keine korrespondierende Bande im Leichtkettenbereich gegenübersteht (Abb. 2).

### *Impräzision der Immunfixations-Elektrophorese*

Für die IFE des Harns zum Nachweis von BJP beträgt der VK der Intraassay-Präzision 12% und derjenige der Interassay-Präzision 30%. Die Daten betreffen den BJP-Konzentrationsbereich von 200–800 mg/l, ermittelt mit der Biuret-Methode, und gelten für den Kappa- und Lambda-Leichtkettentyp.

### *Nachweisempfindlichkeit der Immunfixations-Elektrophorese*

Werden Anti-Human-Ig/L-Ketten Antisera zum Nachweis von BJP im Harn eingesetzt, liegt die minimale detektier-

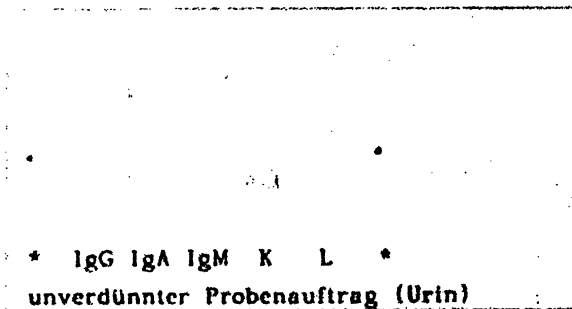


Abb. 1: IFE eines Spontanharnes. Fragestellung Bence Jones-Proteinurie bei einem Myelompatienten. Im Harn findet sich monoklonales Immunglobulin der Klasse IgA Typ Kappa und Bence Jones-Protein Typ Kappa.

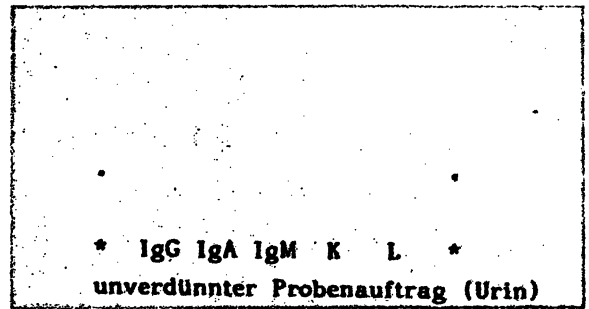


Abb. 2: IFE eines Spontanharnes. Fragestellung der  $\alpha$ -Ketten-Ausscheidung bei  $\alpha$ -Ketten-Krankheit. Isolierter Nachweis von monoklonalem Immunprotein der Klasse IgA; korrespondierende Leichtkettenpräzipitationen fehlen. Es handelt sich entweder um  $\alpha$ -Schwerketten oder um Bruchstücke von  $\alpha$ -Schwerketten.

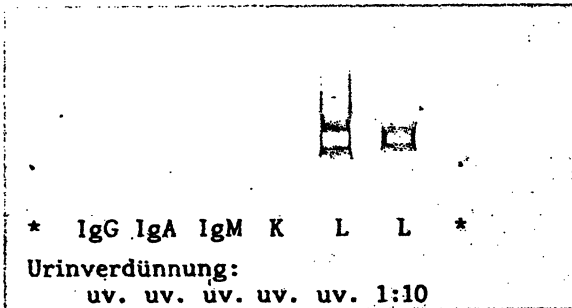


Abb. 3: Bence Jones-Proteinurie vom Typ Lambda. Verursacht durch Antigenüberschuß findet sich eine scharf begrenzte ungefärbte Zone (Zonenphänomen) in der Lambda-Typ-Präzipitation. Die Verdünnung des Urins um den Faktor 10 führt zum Verschwinden des Zonenphänomens.

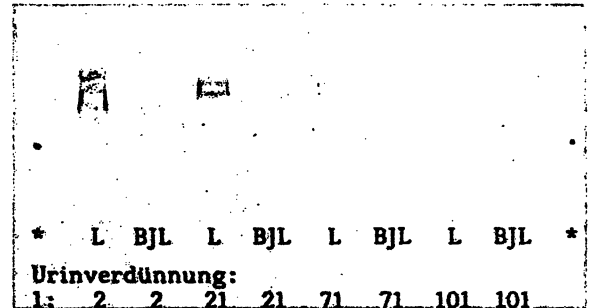


Abb. 4: Bence Jones-Proteinurie vom Typ Lambda. Die Harnprobe liegt in 4 Verdünnungsstufen (von 1:2 bis 1:101) vor. Besonders deutlich ist das schwächere Immunpräzipitationsverhalten des Antiserums gegen freie Lambda-Ketten (BJL) gegenüber dem Antiserum gegen gebundene Lambda-Ketten (L) in den Verdünnungsstufen 1:2 und 1:21 anhand des Zonenphänomens zu erkennen. Weiteres Verdünnen läßt durch Reduzierung des Antigenüberschusses das Zonenphänomen verschwinden.

bare Konzentration (MDK) der IFE in den 5 untersuchten Harnen zwischen 9 und 20 mg/l (Tab. 1).

Werden hingegen Anti-Human-Ig/freie L-Ketten Antisera zum Nachweis von BJP im Harn eingesetzt, nimmt die Nachweisempfindlichkeit etwa um den Faktor zwei ab (Tab. 1).

Tab. 1: Minimal detektierbare Konzentration (mg/l) an BJP, die mittels Immunfixations-Elektrophorese unter Verwendung der Antiseren Anti-Human-Ig/L-Kette Typ Kappa bzw. Lambda und Anti-Human-Ig/freie L-Kette Typ Kappa bzw. Lambda ermittelt wurde.

Anti-Human-Ig/L-Kette					
BJP-Typ	Kappa	Kappa	Lambda	Lambda	Lambda
Harn-Nr.	4	5	6	9	14
MDK (mg/l)	14,6	19,5	11,9	9,3	18,0

Anti-Human-Ig/freie L-Kette					
BJP-Typ	Kappa	Kappa	Lambda	Lambda	Lambda
Harn-Nr.		5		9	14
MDK (mg/l)		64,7		14,0	24,5

### Zonenphänomen

Liegt die Konzentration von BJP im Urin oberhalb des Äquivalenzbereiches des Antigen-Antikörpersystems, kommt es innerhalb des Immunpräzipitates zu einer scharf abgegrenzten ungefärbten Zone. Der Rand dieser Zone entspricht dem Äquivalenzbereich des Antigen-Antikörper-Systems (Abb. 3). Bei einem Antikörpergehalt des Antiserums Anti-Human-Ig/L-Kette von 2,55 E/ml für den Kappa-Typ und 4,50 E/ml für den Lambda-Typ trat in unserem IFE-System ein Zonenphänomen auf, wenn die BJP-Konzentration in den Harnen über 2 g/l für den Kappa-Typ und über 1 g/l für den Lambda-Typ lag. Unter Berücksichtigung der Impräzision der IFE muß mit der Ausbildung eines Zonenphänomens bereits gerechnet werden, wenn die BJP-Ausscheidung vom Kappa-Typ über 1,4 g/l und vom Lambda-Typ über 0,7 g/l beträgt.

Das Zonenphänomen kann das Vorliegen von zwei monoklonalen Banden vortäuschen. Erst durch die Verdünnung des Harnes wird es beseitigt, da der Äquivalenzbereich mit seinen vorwiegend unlöslichen Immunkomplexen wieder erreicht wird (Abb. 3).

Zeigt das Zonenphänomen hingegen keine Tendenz zur Auflösung, muß an die Existenz weiterer monoklonaler Immunproteine oder an das Vorliegen von Immunproteinen in mono-, di- bzw. polymerer Form gedacht werden.

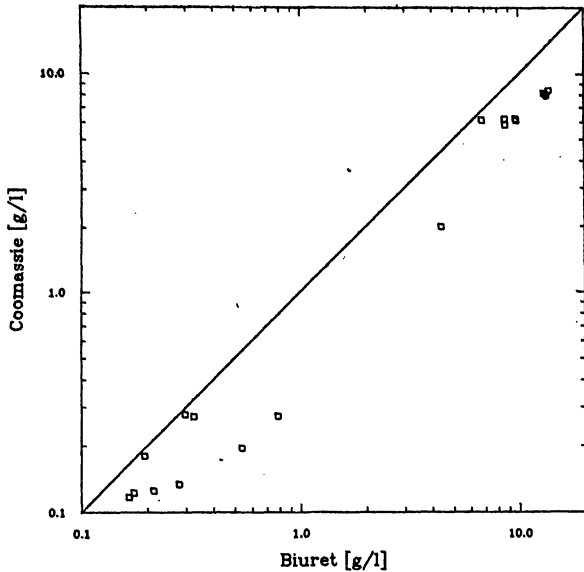


Abb. 5: Vergleich zweier Proteinbestimmungs-Methoden zur quantitativen Bestimmung von Bence Jones-Protein im Harn. Den mit der Coomassie-Methode ermittelten BJP-Konzentrationen sind die mit der Biuret-Methode bestimmten gegenübergestellt.

Ein Zonenphänomen tritt bei gleicher Harnverdünnung früher und in stärkerem Ausmaß auf, wenn Antiseren gegen Ig/freie L-Kette anstatt Antiseren gegen Ig/L-Kette verwendet werden, da der Äquivalenzbereich bei ersteren schmaler und zu niedrigerer BJP-Konzentration hin verschoben ist (Abb. 4).

#### Vergleich der Biuret- mit der Coomassie-Methode zur quantitativen BJP-Bestimmung

Der Methodenvergleich in Abb. 5 zeigt, daß mit der Coomassie-Methode generell niedrigere BJP-Konzentrationen im Harn bestimmt werden als mit der Biuret-Methode.

In den untersuchten Harnen wurden im BJP-Konzentrationsbereich von 0,16–13,8 g/l minimal 35% und maximal 94% des mit der Biuret-Methode bestimmten Konzentrationswertes gefunden. Im Einzelfall wurden in verschiedenen Harnsammelperioden desselben Patienten unterschiedliche Coomassie-Anteile, bezogen auf die mit der Biuret-Methode bestimmte BJP-Konzentration, ermittelt.

Eine Zuordnung unter dem Gesichtspunkt der besonders guten bzw. schlechten Detektierbarkeit eines bestimmten Leichtkettentyps durch die Coomassie-Methode konnte nicht getroffen werden.

Der Methodenvergleich ist in Abb. 5 dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung des gesamten BJP-Konzentrationsbereiches (0,16–13,8 g/l) wurde die logarithmische Darstellungsweise gewählt. Abb. 5 verdeutlicht, daß alle Wertepaare unterhalb der Winkelhalbierenden wiedergefunden werden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß die Wahl der logarithmischen Darstellungsweise rein optisch zur Verzerrung der Korrelation führt.

## Diskussion

In den vergangenen 100 Jahren sind zahlreiche Methoden zum Nachweis der Bence Jones-Proteinurie angegeben worden (13). Der Nachteil dieser Methoden ist entweder eine mangelnde Spezifität oder die geringe Nachweisempfindlichkeit. In vielen Laboratorien wird deshalb der Harn zum Screening auf Bence Jones-Proteinurie vor der eigentlichen Analytik ankonzentriert. Diese Maßnahme führt, insbesondere wenn der Nachweis von BJP nachfolgend durch eine kombinierte elektrophoretisch-immunologische Methode erfolgt, zu interpretativen Problemen, resultierend aus anomal wandernden oder multiplen oder verwaschenen oder verschmolzenen Banden. Das Arbeiten mit unkonzentriertem Urin ist deshalb eine wichtige Voraussetzung für die problemlose Erkennung einer Bence Jones-Proteinurie mittels der IFE.

Als Methoden des empfindlichen BJP-Nachweises unter 0,2 g/24 Std. im unkonzentrierten Harn werden neben der IFE Immunoassays und die Immunnephelometrie empfohlen. Beide Methoden haben eine geringere Spezifität als die IFE und erlauben nicht den parallelen Nachweis von BJP und monoklonalem Immunglobulin.

Vor dem Screening einer Harnprobe auf BJP mittels der IFE sollte die Harnproteinkonzentration bekannt sein, damit durch eine entsprechende Verdünnung der Harnprobe ein Zonen- oder gar Auslöschphänomen vermieden werden kann. Bei einer Proteinkonzentration des Harns über 1,0 g/l sollte deshalb der Harn unverdünnt und in einer 1:5-Verdünnung in der IFE untersucht werden.

Die Harnproteinbestimmung sollte in Untersuchungsproben zum BJP-Nachweis nicht mit der Coomassie-Methode erfolgen, da bedingt durch eine geringere Bindung von Coomassie Brilliant Blau G 250 an BJP als an Albumin immer eine niedrigere Proteinkonzentration vorgetäuscht wird als mit der Biuret-Methode. Die Nachweisempfindlichkeit der Biuret-Methode liegt bei 120 mg/l (9), somit kann mit der IFE auch in „Biuret-negativen“ Harnen BJP nachgewiesen werden.

Bei der Immunfixation mit Antiseren gegen freie Leichtketten wird zum Nachweis von BJP keine Trennspur für den Nachweis von intakten Immunglobulinen benötigt, was bei der Verwendung von Antisera gegen gebundene Leichtketten erforderlich ist. Wir empfehlen aber trotzdem die Immunfixation mit Antiseren gegen gebundene Leichtketten und das Mitführen einer Trennspur für die Immunfixation von intaktem IgG, evtl. auch IgA oder IgM, da

- die Avidität der Antiseren gegen gebundene Leichtketten größer ist als die derjenigen gegen freie Leichtketten. Ein Zonen- oder gar Auslöschphänomen tritt deshalb bei der Immunfixation mit Antiseren gegen freie Leichtketten bei niedrigerer BJP-Konzentration auf als bei der Verwendung von Antiseren gegen gebundene Leichtketten.
- der Informationsgehalt höher ist. Die kombinierte Ausscheidung von BJP und intaktem Immunglobulin wird bei alleiniger Verwendung von Antiseren gegen freie Leichtketten nicht erkannt.
- die Nachweisempfindlichkeit höher ist.

Die intraserielle Impräzision der IFE zum Nachweis von BJP zeigt einen Variationskoeffizient, wie er für die in der optischen Dichte als gleichstark anzusehende  $\alpha_1$ -Globulinfraktion in Serumweiß-Elektrophorese auf Zelluloseacetatfolie noch erlaubt ist (14).

Wir glauben, daß durch unseren aufgezeigten Weg  
– der Bestimmung der Harnproteinkonzentration vermit-  
tels der Biuret-Methode und  
– der anschließenden IFE des unkonzentrierten Harns,  
alle klinisch relevanten Bence Jones-Proteinurien mit ho-  
her Zuverlässigkeit erfaßt werden.

Anschrift der Verfasser:

Dr. med. Maren Messinger  
Prof. Dr. L. Thomas  
Krankenhaus Nordwest  
– Zentrallabor –  
Steinbacher Hohl 2–26  
6000 Frankfurt/Main 90

Schrifttum:

1. Pezzoli, A., Pascoli, E. (1988) The clinical significance of pure Bence Jones proteinuria at low concentration. *A. J. C. P.* 91, 473–475.
2. Baus, M., Müller, T., Thomas, L. (1988) Immunfixations-Elektrophorese zum Nachweis monoklonaler Gammopathien: Durchführung, Interpretation, Fehlermöglichkeiten. *Lab.med.* 10, 192–200.
3. Robinson, E. L., Gowland, E., Ward, I. D., Scarffe, J. H. (1982) Radioimmunoassay of free light chains of immunoglobulins in urine. *Clin. Chem.* 28, 2254–2258.
4. Brouwer, J., Otting van de Ruit, M., Busking van der Lely, H. (1985) Estimation of free light chains of immunoglobulins by enzyme immunoassay. *Clin. Chim. Acta* 150, 267–274.
5. Boege, F., Koehler, H., Liebermann, F. (1990) Identification and quantification of Bence Jones proteinuria by automated nephelometric screening. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18, 37–42.
6. Levison, S. S. (1992) Studies of Bence Jones Proteins by immunonephelometry. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 22, 100–109.
7. Bauer, K. (1982) Immunfixation. *Berichte ÖGKC* 5, 175–179.
8. Hofmann, W., Schmidt, D., Guder, W. G. (1991) Die Urineiweißbestimmung – Versuch einer kritischen Standortbestimmung. *Lab.med.* 15, 133–137.
9. Thomas, L., Winkelmann, M., Michaelis, H. C., Waib, D. (1981) Proteinbestimmung im Harn mit dem Proteinbindungsfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 203–208.
10. Merck, E. (1988) Arbeitsanleitungen Klinische Chemie. *Diagnostica Merck*, 67–69.
11. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
12. Doumas, B. T. (1975) Standards for total serum protein assays – a collaborative study. *Clin. Chem.* 21, 1159–1166.
13. Hobbs, J. R. (1975) Bence Jones proteins. *Essays in Medical Biochemistry*, 1, 105–131.
14. DIN 58938, Teil 2 (1981) Elektrophoretische Trennung von Eiweiß- oder eiweißhaltigen Substanzen in Körperflüssigkeiten. *Beuth Verlag GmbH, Berlin* 1–4.

□