

Die differenzierende Diagnostik monoklonaler und polyklonalter Immunglobuline mit der Immunfixation

H. Mauch und H. J. Hammer

Immunologisches Labor der I. Medizinischen Universitätsklinik, Homburg/Saar (Leiter: Prof. Dr. P. G. Scheurlen)

Zusammenfassung:

Für die Diagnostik monoklonaler Immunglobuline werden die Immunelektrophorese (IE) und die erst in letzter Zeit bekannt gewordene Immunfixationselektrophorese (IFE) angewendet. Für beide Techniken bildet die Zonenelektrophorese den ersten Schritt. An diese schließt sich jedoch in der IFE eine Überschichtung der aufgetrennten Proteine mit spezifischen Antiseren an. Die in der Zonenelektrophorese als schmale Bande vorliegenden Paraproteine kommen durch die Immunfixation noch deutlicher und spezifisch zur Darstellung. Monoklonale Immunglobuline lassen sich sicher von polyklonalen unterscheiden. Die IFE ist der IE in der Identifizierung monoklonaler Immunglobuline insbesondere dann überlegen, wenn sie entweder im Überschuß oder in geringer Konzentration vorliegen. Ebenso ist die Diagnostik von Bence-Jones Proteinen verbessert. Auch zeichnet sich die IFE durch Schnelligkeit, einfache Durchführbarkeit und geringen Materialverbrauch aus.

Schlüsselwörter:

Paraproteine – Immunfixation – Immunelektrophorese

Summary:

Monoclonal immunoglobulins can be identified by immuno-electrophoresis (IE) and recently by immunofixation electrophoresis (IFE). The first step in both techniques is the conventional serum electrophoresis. In IFE separation of serumproteins is followed by an overlay of specific antiserum. Thus the narrow zones of paraproteins become intensified by immunofixation and can be easily differentiated from polyclonal immunoglobulins. IFE is superior to immuno-electrophoresis in the identification of paraproteins in high and in low concentrations and of Bence-Jones proteins. Additional advantages are speed, simplicity and economy.

Key words:

paraproteins – immunofixation – immuno-electrophoresis

Einleitung

Die Diagnose des Plasmozytoms und der Makroglobulinämie Waldenström stützt sich neben dem Knochenmarksbefund auf den Nachweis monoklonaler Immunglobuline („Paraproteine“) im Serum oder Urin. Monoklonale Immunglobuline bilden in der Zonenelektrophorese eine schmale Bande, während

sich polyklonale Immunglobuline diffus im Gamma-globulinbereich verteilen. In der Immunelektrophorese lässt sich die Monoklonalität der Immunglobuline an der starken Deformierung der Präzipitationslinie erkennen und daran, daß diese Deformierung nur einer leichten Kette Kappa oder Lambda zuzuordnen ist. Relativ häufig bereitet die Interpretation der Präzipitationslinien, insbesondere für den Un-

geübten, Schwierigkeiten. Einige IgM-, IgA- oder IgG-Paraproteine sind nicht als monoklonale Immunglobuline einzuordnen, wenn die Leichtketten-differenzierung durch den sogen. „Schirmeffekt“ der IgG-Moleküle verhindert wird (5), keine eindeutige Deformierung der Präzipitationslinie zu erkennen ist oder das Paraprotein in niedrigen Konzentrationen vorliegt. Die zweidimensionale Immunelektrophorese ist zu aufwendig und überwiegend wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten. Einen Ausweg aus diesen diagnostischen Schwierigkeiten zeigt die erst in letzter Zeit für die Paraproteindiagnostik bekannt gewordene Immunfixationselektrophorese (2, 3, 4, 8). Sie vereint die Vorteile der zweidimensionalen Immunelektrophorese (Sensitivität) mit denen der klassischen Immunelektrophorese (einfache Handhabung).

Material und Methode

Antiseren:

Folgende Antiseren wurden eingesetzt: Anti- α -, Anti- γ -, Anti- μ -, Anti- κ -, Anti- λ , Anti-Human-Seren vom Kaninchen (Dako-Boehringer, Ingelheim; Behringwerke, Marburg). Trivalentes Anti- α , γ , μ -Serum und Anti-Kappa-Lambda-Serum wurden durch Mischen der entsprechenden Einzelseren in gleichen Teilen hergestellt.

Agaroseelektrophorese:

Die Technik wurde vor kurzem ausführlich beschrieben (1, 3): Die Elektrophorese wurde in 0,8%iger Agarose auf Polyesterfolie nach Auftragen von 2 μ l einer unverdünnten Serumprobe in einen entsprechend vorgestanzten Probenschlitz über etwa 1 h bei 5° C durchgeführt (Multiphor, LKB, München).

Immunfixation:

Nach der von Ritchie und Smith beschriebenen Technik (7) wurde die Agarose an der Stelle der aufgetrennten Patientenserien mit den entsprechenden Antiseren überschichtet. Die Überschichtung erfolgte mit Zelluloseazetatstreifen, die mit Antiseren getränkt waren. Die Präzipitatbildung zwischen den Immunglobulinen und den spezifischen Antiseren war nach ca. 1 h abgeschlossen. Nach Waschen, Trocknen und Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B ließ sich die Folie für Dokumentationszwecke leicht aufbewahren.

Die Immunelektrophorese wurde nach der von Scheidegger (6) beschriebenen Methode durchgeführt.

Abb. 1:

Normalserum mit polyklonalen IgG, IgA, IgM (NS, oben) und Patientenserum mit monoklonalem IgG-lambda (PS, unten)

AE = Agaroseelektrophorese, NS = Normalserum

PS = Patientenserum, G = Anti- γ -Serum

A = Anti- α -Serum, M = Anti- μ -Serum

K = Anti-Kappa-Serum, L = Anti-Lambda-Serum

Die Kathode ist links.

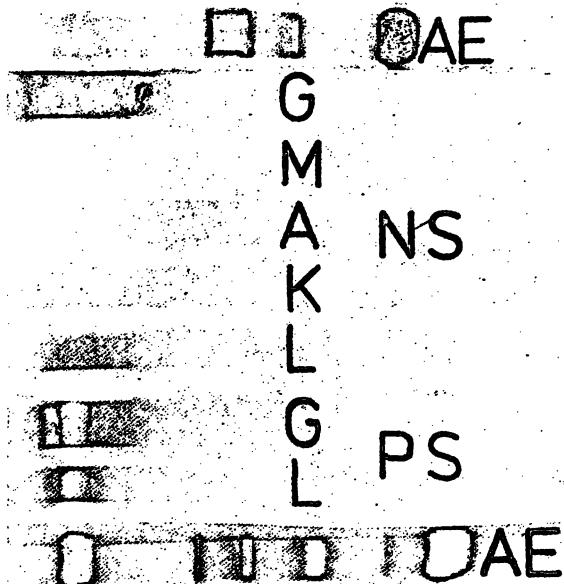


Abb. 2:

Immunelektrophorese (oben) und Immunfixation (unten) eines IgG-kappa Paraproteins und eines Bence-Jones-kappa-Proteins. Seren und Antiseren s. Abb. 1. Die Kathode ist links.

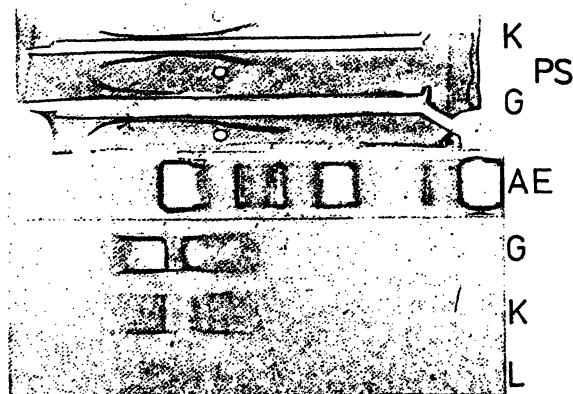
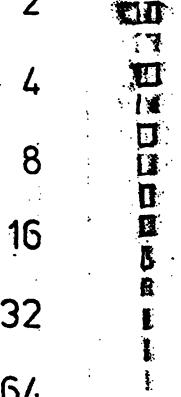
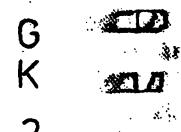
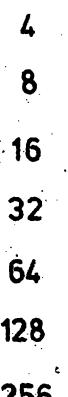


Abb. 3:

Verdünnungsreihe eines Serums mit monoklonalem IgG-Kappa. Seren und Antiseren s. Abb. 1. Die Kathode ist links.

**Abb. 4:**

Verdünnungsreihe eines Serums mit polyklonalem IgG-Kappa. Seren und Antiseren s. Abb. 1. Die Kathode ist links.



Ergebnisse und Diskussion

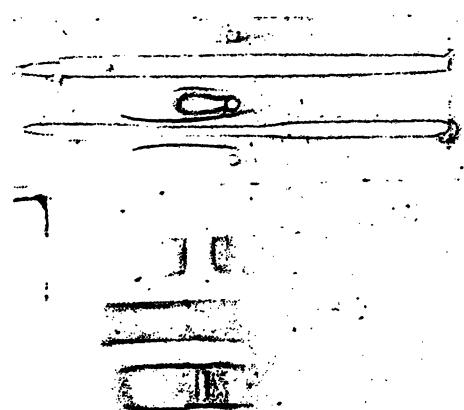
Polyklonale Immunglobuline präzipitieren in der Immunelektrophorese als langgezogene Linie und in der Immunfixation als breite diffuse Zone (Abb. 1, NS). Monoklonale Immunglobuline sind in der Immunelektrophorese an einer Deformierung der Präzipitationslinie (Abb. 2, oben, PS), in der Agaroseelektrophorese (Abb. 2, AE) und der IFE als relativ schmale, stark angefärbte Präzipitationsbande zu erkennen (Abb. 1 PS, Abb. 2, unten). Bei hohen Paraproteinkonzentrationen lösen sich die Präzipitate wieder auf (Antigenüberschüßbereich der Heidelberger Präzipitationskurve). Dies macht sich in der IE unter Umständen dadurch nachteilig bemerkbar, daß keine Präzipitationslinie mehr zu erkennen ist. In der IFE hingegen bildet sich eine helle Zone in der Bandenmitte, die von deutlich angefärbten Randzonen umgeben ist (Abb. 1, unten PS; Abb. 2, unten G, K; Abb. 3; Abb. 5, unten M, K, L). Paraproteine in hohen Konzentrationen kommen daher in der IFE noch deutlicher zur Darstellung als in der Immunelektrophorese. Die stark angefärbten Randzonen, die den Äquivalenzzonen zwischen Immunglobulinen (Antigen) und Antikörpern entsprechen, rücken bei zunehmender Verdünnung zusammen (Abb. 3, Mitte), bis sie verschmelzen (Abb. 3, Verdünnung 1 : 32 – 1 : 64) und schließlich eine schmale Präzipitationsbande bilden. Polyclonales Immunglobulin verteilt sich hingegen auch bei zunehmender Verdünnung diffus über eine breite Zone im Gammaglobulinbereich (Abb. 4). Auch IgM-Paraproteine in hohen Konzentrationen präzipitieren in der Immunelektrophorese häufig nur als sog. Depofleck (Abb. 5, oben). Der Vergleich mit der IFE zeigt (Abb. 5, unten), daß sich dieses Paraprotein in der IFE sofort einem monoklonalen IgM vom Typ lambda zuordnen läßt.

Die Immunfixation eignet sich auch zur Identifizierung von Paraproteinen in niedrigen Konzentrationen, die mit der Immunelektrophorese nicht mehr erfaßt werden. Anschaulich ist dies aus Abb. 2 zu ersehen, in der das Bence-Jones-Kappa-Protein nur in der Immunfixation (anodisch gelegene, zarte Bande mit Anti-Kappa Serum), nicht jedoch in der Immunelektrophorese abgebildet ist. Eine wichtige Indikation für die Immunfixation stellt demnach die Diagnostik von Bence-Jones-Proteinen dar. Sie lassen sich im Urin viel eindeutiger von polyclonalen Immunglobulinen und deren Spaltprodukten unterscheiden als in der Immunelektrophorese und sind oft bereits im Serum zu erkennen.

Die untere Nachweigrenze der IFE für Paraproteine liegt mit 20–50 µg/ml sehr viel tiefer als bei der IE. Das in Abb. 3 dargestellte monoklonale IgG-kappa (22 g/l) ließ sich in der IFE bis zu einer Verdünnung von 1 : 1026 nachweisen, in der Immunelektropho-

Abb. 5:

Patientenserum mit einem IgM-lambda Paraprotein in hoher Konzentration. Seren und verwendete Antiseren s. Abb. 1. Die Kathode ist links.



rese nur bis zu einer Verdünnung bis 1 : 64; die typische Deformierung der Präzipitationslinie war in der IE nur bis zu einer Verdünnung von 1 : 8 – 1 : 16 zu erkennen. Entsprechend wurden in unserem Patientengut mit der IFE 70 Paraproteine, mit der IE hingegen nur 51 Paraproteine entdeckt (3).

Die technischen Vorteile der Immunfixation fallen ebenso ins Gewicht: Die gesamte Zeitdauer bis zum Vorliegen der Präzipitate beträgt bei der IFE nur 3 Stunden (bei der IE 18 Stunden). Der Arbeitsgang verläuft kontinuierlich; für eine Analyse werden nur 20 µl Antiserum verbraucht, in der IE dagegen 50 µl. Die IFE erfordert keinen größeren technischen Aufwand als die IE. Im Routinebetrieb kann man sich zunächst auf eine Screening-Untersuchung der Serumproben mit trivalentem (α , γ , μ)-Antiserum und Leichtketten (χ , λ)-Antiserum beschränken. Bei Vorliegen einer Bande können dann zur Identifizierung des Paraproteins monospezifische Antiseren eingesetzt werden.

In Übereinstimmung mit anderen Autoren (2, 4, 8) sind wir auf Grund der beschriebenen Vorteile der IFE der Auffassung, daß die Immunfixation als diagnostische Methode zum Paraproteinnachweis gegenüber der Immunelektrophorese eine entscheidende Verbesserung darstellt.

Danksagung: Wir danken Fr. U. Lang und Fr. U. Eisenbeis für die ausgezeichnete technische Mitarbeit.

Schrifttum

1. JEPSON, J. D., LAURELL, C. B., FRANZÉN, B.: Agarose gel electrophoresis. Clin. Chem. 25, 629–638 (1979).
2. MARSHALL, M. O.: Comparison of immunofixation and immunoelctrophoresis methods in the identifications of monoclonal immunoglobulins in serum. Clin. Chim. Acta 104, 1–9 (1980).
3. MAUCH, H., HAMMER, H. J., SCHEURLEN, P. G.: Die Immunfixation: Fortschritt in der Paraproteinadiagnostik, ein Vergleich mit der Immunelektrophorese. Klin. Wschr. 1981, eingereicht.
4. PÉDERSEN, N. S., AXELSEN, N. H.: Detection of M-components by an easy immunofixation procedure: Comparison with agarose gel electrophoresis and classical immunoelctrophoresis. J. Immunol. Methods 30, 257–262 (1979).
5. PHILIPPS, D. J., SHORE, S. L., MADDISON, S. E. et al: Comparative evaluation of commercial precipitating antisera against human IgA. J. Lab. Clin. 77, 639–644 (1971).
6. SCHEIDECKER, J. J.: Une microméthode de l'immunoeléctrophorese. Int. Archs. Allergy Appl. Immunol. 7, 103–110 (1955).
7. RITCHIE, R. F., SMITH, R.: Immunofixation I. General principles and application to agarose gel electrophoresis. Clin. Chem. 22, 497–499, (1976).
8. RITCHIE, R. F., SMITH, R.: Immunofixation III. Application to the study of monoclonal bands. Clin. Chem. 22, 1982–1985 (1976).

Anschrift für die Verfasser:

Dr. H. Mauch
Immunologisches Labor der
I. Medizinischen Universitätsklinik,
D - 6650 Homburg/Saar

Messe-service

Treffpunkt MEDICA 81

Sind Sie unser Guest am Messestand des
Kirchheim Verlages
Halle 03, Stand 3 E 20
Düsseldorf, 18.–21. November 1981

LABORATORIUMS MEDIZIN

Der Allgemeinarzt

Ihre Gesprächspartner

- Schriftleiter
- Redakteure
- Autoren
- Anzeigenleiter
- Außendienstmitarbeiter
- Vertriebsleiter

Unser Service

- individuell
- informativ
- interessant

Laboratoriumsmedizin
Ihr Partner

auf der

MEDICA 81

