

# Moderne Methoden zur Proteindifferenzierung im Urin\*

## Modern Methods for Differentiation of Urinary Proteins

W. Hofmann, W. G. Guder

Städt. Krankenhaus München-Bogenhausen

### Zusammenfassung:

*Die derzeit üblicherweise durchgeführte Labordiagnostik von Nierenerkrankungen erfüllt nicht alle medizinischen Erfordernisse. Eine moderne Urinanalytik sollte das Ausmaß einer Proteinurie erfassen und eine Aussage über die Art der Schädigung erlauben, d.h. zwischen glomerulären, tubulären und extrarenalen Formen differenzieren können. Dies ist durch die sensitive quantitative Bestimmung einzelner Markerproteine (IgG, Albumin,  $\alpha_1$ -Mikroglobulin, N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase) und Gesamteiweiß realisiert. Durch Messung der Konzentrationen im 2. Morgenurin und Bezug auf g Creatinin (mmol Creatinin) werden die biologischen Einflußgrößen (Diuresezustände, Tagesrhythmik und Sammelfehler) reduziert. Liegt die Protein-, Albumin- und N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase-Ekretion im Referenzbereich und ist der Nachweis von Leukozytenesterase und Hämoglobinperoxidase mit dem Teststreifen negativ, so kann eine renale Dysfunktion mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Bei positivem Testergebnis schließt sich ein differentialdiagnostisches Stufenprogramm an, das neben der Messung weiterer Harnproteine, morphologische (Phasenkontrastmikroskopie, Zytologie), immunologische (Immunfixation) und elektrophoretische Methoden beinhaltet.*

### Schlüsselwörter:

Proteinurie – IgG – Albumin –  $\alpha_1$ -Mikroglobulin – N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase – diagnostische Strategie

### Summary:

*The usual laboratory diagnostic program for detection of renal diseases does not fulfill all medical requirements. A modern strategy should be able to quantify and differentiate proteinuria. This means, that glomerular, tubular and extrarenal forms should be differentiated. This is realized by quantification of marker proteins (IgG, albumin,  $\alpha_1$ -microglobulin, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase) in combination with total protein. Relating the concentrations measured in the second morning urine to g creatinine (mmol creatinine) can reduce different biological influence factors (diuresis, diurnal rhythm) and errors in sample collection. A renal dysfunction can be excluded with high probability if normal values for the excretion rates of marker proteins, leucocyte esterase and hemoglobin peroxidase (dipstick results) are obtained. Positive results are differentiated by a diagnostic strategy which includes besides quantitative measurements of proteins morphological (phase contrast microscopy, cytology), immunological (immunofixation) and electrophoretic procedures.*

### Keywords:

Proteinuria – IgG – Albumin –  $\alpha_1$ -microglobulin – N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase – Diagnostic strategy

## Entspricht die derzeit durchgeführte Urinanalytik den medizinischen Erfordernissen?

Die konventionelle Labordiagnostik der Niere beinhaltet einerseits klassische Kenngrößen wie Serumcreatinin, Serumharnstoff und die Creatinin-clearance zur Erfassung von Änderungen der glomerulären Filtrationsrate, andererseits Teststreifenuntersuchungen mit dem Nachweis von Leukozyten, Erythrozyten, Glucose, pH und Protein, sowie die quantitative Gesamteiweißbestimmung im 24 Std.-Urin.

Creatinin und Harnstoff haben den Nachteil, daß erst bei einem Verlust von 30–50% der funktionsfähigen Nephronen pathologisch erhöhte Werte im Serum auftreten. Gleichzeitig besteht für Creatinin eine Abhängigkeit von der Muskelmasse, und für den Harnstoff von der aufgenommenen Eiweißmenge (1). Die Creatinin-clearance als möglicher Ausweg weist zwar wesentlich früher, im sogenannten creatininblinden Bereich, auf eine Einschränkung der glomerulären Filtration hin, aber die Abhängigkeit vom Muskelstoffwechsel und die Tatsache, daß Creatinin bei eingeschränkter glomerulärer Filtration auch sezerniert wird, relativieren den Stellenwert dieses Verfahrens (1).

Auch die anfängliche Euphorie, daß mit dem sog. Teststreifensieb als Screeningverfahren alle relevanten patho-

\* Vortrag März 1989 in Lemgo, 3. Norddeutsche Laborgesprache.

logischen Veränderungen erfaßt würden, hat sich in den letzten Jahren relativiert. Beispielhaft möchten wir auf die sog. Mikroalbuminurie bei Diabetikern hinweisen, die unterhalb der Nachweisgrenze des Proteinestfeldes von 300 mg/l liegt und somit mit dem Teststreifen nicht erfaßt wird.

Aber gerade die Mikroalbuminurie, von Mogensen als Ausdruck des Stadiums III der diabetischen Nephropathie (2) beschrieben, sollte erkannt werden, da Diabetiker mit diesem Stadium bei nicht optimaler Blutzucker- und Blutdruckeinstellung innerhalb von 7–8 Jahren eine irreversible Niereninsuffizienz entwickeln können (3).

Als weiteres Beispiel für die Unzulänglichkeit der Teststreifenerfassung auf Protein möchten wir die Bence-Jones-Proteinurie aufführen, die in den seltensten Fällen erfaßt wird. Selbst bei einer Ausscheidung von 1 g Eiweiß pro 24 Std. bei gleichzeitig bestehender Albuminausscheidung unterhalb von 200 mg/l wird ein negatives Teststreifenergebnis erhalten (4).

Als drittes Beispiel sei auf die Gruppe der nephrotoxischen Medikamente wie Aminoglykoside, nicht steroidale Anti-Rheumatika und Cytostatika hingewiesen, die

interstitielle Veränderungen hervorrufen und zu einem Umbau der Niere führen, ohne daß wir diese Veränderungen zu Beginn mit dem Serumcreatinin oder dem Proteinestfeld erfassen.

Die Gesamteiweißbestimmung kann, da sie als Globalverfahren kleinmolekulare und großmolekulare Proteine in unterschiedlichem Ausmaß erfaßt, dieses Problem ebenfalls nur bedingt lösen (5, 6). Sie stellt immer nur einen Kompromiß dar, da sie weder von der Spezifität noch von der Richtigkeit die Anforderungen an ein quantitatives Analyseverfahren erfüllt (8).

Tab.1 faßt die Vor- und Nachteile der verwendeten Verfahren zur Proteinbestimmung im Urin zusammen (5–7).

## Forderungen an eine moderne Proteinuriediagnostik

Eine moderne Proteinuriediagnostik sollte eine Aussage über die Art der Schädigung zulassen, d. h. zwischen glomerulären, tubulären und extrarenalen Proteinurien differenzieren.

Aufgrund neuerer pathophysiologischer und pathobiochemischer Erkenntnisse können diese Formen charakterisiert werden (Abb.1).

Üblicherweise liegt die Proteinfiltrationsrate um 100 mg/min. Durch Rückresorption im proximalen Tubulus von über 99% der filtrierten Proteine resultiert eine normale Proteinexkretionsrate von unter 70 mg/24 Std. (Turbidimetrie mit Trichloressigsäure).

Kommt es durch Schädigung der glomerulären Basalmembran zu einer vermehrten Proteinfiltration, so kann zwar die Proteinrückresorption kompensatorisch gesteigert werden, aber per saldo kommt es doch zu einer vermehrten Eiweißausscheidung (*glomeruläre Proteinurie*). Hierbei unterscheidet man selektiv glomeruläre, bei vermehrtem Auftreten von Albumin und Transferrin (z. B. bei minimal change Nephropathie), von nicht selektiven glomerulären Proteinurien, bei der zusätzlich vermehrt IgG ausgeschieden wird (z. B. mesangioproliferative Glomerulonephritiden, z. B. der von Berger beschriebenen IgA-Nephritis, membranproliferative Glomerulonephritiden und akut postinfektiöse Glomerulonephritisformen).

Liegt eine primäre Schädigung der proximalen Tubuluszelle vor, so ist bei unauffälliger glomerulärer Proteinfiltration die Proteinrückresorption vermindert. Es resultiert eine vermehrte Ausscheidung kleinmolekularer Proteine (*tubuläre Proteinurie*). Diesen Proteinurietyp findet man bei abakteriellen interstitiellen Nephritiden, bei akut bakteriell interstitiellen Nephritiden sowie tubulären Schädigungen, verursacht durch Medikamente, wie Aminoglykoside, nicht steroidale Antirheumatika und Analgetika.

Die kombinierte Schädigung des glomerulären und tubulären Apparates führt zu glomerulo-tubulären Mischproteinurien.

Dieses typische Proteinausscheidungsmuster findet man bei fortgeschrittenen glomerulären bzw. interstitiellen Nierenerkrankungen. Von diesen renalen Formen einer Proteinurie müssen prä- bzw. postrenale Proteinurien unterschieden werden. Als Ursache einer prärenalen Proteinurie kommen u. a. Bence-Jones-Proteinurien, Myoglobulinurien (Crush) und Hämoglobinurien (intravasale Hämolyse) in Betracht. Postrenale Proteinurien findet

Tab. 1

Methode	Vorteile	Nachteile
Teststreifen	Jederzeit verfügbar Rasch (1 min) Relativ albuminspezifisch	Hohe Nachweisgrenze (ca. 300 mg/l) Kein quantifizierbares Signal Negativ bei prärenaler und tubulärer Proteinurie
TCA/HCl (Turbidimetrie oder Nephelometrie)	Erfassung aller diagnostisch relevanten Proteine Nachweisgrenze und Probenbedarf niedrig Großer Meßbereich Keine Probenvorbereitung nötig Automatisierbar Rasch (2–3 min)	Manuelle Methode nur mit nichtlinearer Eichkurve möglich
Coomassie brilliant blue bzw. Serva blue	Erfassung aller relevanten Proteine (mit SDS-Zusatz) Nachweisgrenze und Probenbedarf niedrig Keine Vorbehandlung nötig Automatisierbar Rasch (2–3 min)	Chargenabhängige Extinktion und Störungen durch Verunreinigung Temperaturfehler Verdünnungsfehler Geringer Meßbereich Färbung von Küvetten und Schläuchen
Biuret	Gleiche Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Harnproteinen Großer Meßbereich Hohe Stabilität des Reagenzes und des Farbkomplexes	Hohe Nachweisgrenze Störfaktoren mit und ohne Säurefällung Schwer automatisierbar Zeitaufwendig (40–60 min)

man bei Entzündungen bzw. Blutungen im Bereich der ableitenden Harnwege.

## Methoden zur Differenzierung

Ende der 70er Jahre wurde in Deutschland von Boesken und Mitarb. die SDS-Gradientengelelektrophorese zur differenzierten Eiweißdiagnostik eingeführt. Dieses qualitative Verfahren erlaubt Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen und zu charakterisieren (9).

Wünscht man darüber hinaus ein quantitatives Ergebnis, um das Ausmaß der Proteinurie sowie die Verhältnisse der klein- und großmolekularen Proteine zueinander zu erkennen, muß man zu anderen Verfahren greifen.

Wir haben uns daher als charakteristische Markerproteine, Albumin und IgG, herausgegriffen, um zwischen selektiven und nicht selektiven glomerulären Proteinurien zu unterscheiden.  $\alpha_1$ -Mikroglobulin scheint uns geeignet als Marker zur Erfassung von Störungen der tubulären Proteinrückresorption. Zusätzlich bestimmen wir die Aktivität der N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase, als Marker der zellulären Integrität proximaler Tubuluszellen.

Dieses lysosomale Enzym hat sich in den letzten Jahren in vielen Studien als mögliche Kenngröße zur Erfassung von Zellschädigungen herauskristallisiert (13, 14). Stabilität unter physiologischen Bedingungen und bei Lagerung über 7 Tage, Automatisierbarkeit der Methode, bei Verwendung unverdünnter Urine, lassen die Methode als geeignet für die Routinediagnostik erscheinen (10).

Neben einer konventionellen kinetischen Bestimmung des Creatinins nach der Jaffé-Methode haben wir eine turbidimetrische Gesamteiweißbestimmung mit Trichloressigsäure (TCA), immunologisch turbidimetrische Tests für die IgG-, Albumin- und  $\alpha_1$ -Mikroglobulin-Bestimmung auf den Analysenautomaten Kone specific adaptiert (10).

Die Nachweisgrenzen aller verwendeten Methoden liegen innerhalb der Normalbereiche (10). Die Linearitäts-

grenzen reichen bis zum 10fachen der oberen Normalbereichsgrenze (10).

Für die Präzision in der Serie liegen die Variationskoeffizienten für die untersuchten Kenngrößen zwischen 1 und 6% (nur für Gesamteiweiß bei 31 mg/l wurde ein VK von 11% ermittelt). Die Präzisionen von Tag zu Tag lagen erwartungsgemäß etwas höher, zwischen 2,5% und 15,6% (10).

Ist eine tägliche Abarbeitung der Urine nicht möglich, so müssen sie entsprechend gelagert werden. Über mindestens 7 Tage bei 4°C fanden wir für die Kenngrößen keine signifikante Abnahme (10). Werden die Urine aber bei -20°C eingefroren, so zeigt IgG nach 7 Tagen einen signifikanten Abfall (10%), nach 30 Tagen war dieser Abfall noch deutlicher (20%) (11, 12). Den gemachten Erfahrungen entsprechend kann man die Urine, bei nicht sofortiger Abarbeitung ohne Zugabe von Stabilisatoren bei 4°C im Kühlschrank lagern.

Potentielle Störfaktoren, wie Leukozyturie, Erythrozyturie und Nitrit hatten auf das Meßergebnis keinen Einfluß (11, 12).

### Welche Probe ist geeignet

Neben analytischen Kriterien spielen bei Urinuntersuchungen für die Beurteilung der diagnostischen Effizienz biologische und präanalytische Faktoren eine wesentliche Rolle. Wie aus der Literatur bekannt, gibt es keine klare Übereinstimmung der Experten, welcher Urin für die Albumin- bzw. N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase-Bestimmung verwendet werden soll. Neben dem 24 Std.-Urin und dem 1. Morgenurin wird auch der 2. Morgenurin propagiert (10). Zur weiteren Klärung dieser Frage haben wir bei 13 Normalpersonen den 2. Morgenurin mit dem 24 Std.-Urin verglichen. Bei Bezug der Kenngrößen auf g Creatinin sahen wir keinen diagnostisch bedeutsamen Unterschied (10). Aus diesen Erfahrungen ergibt sich eine gerade für den ambulanten Bereich praktikablere Empfehlung, den 2. Morgenurin als Alternative zum 24 Std.-Urin als Untersuchungsmaterial zu verwenden.

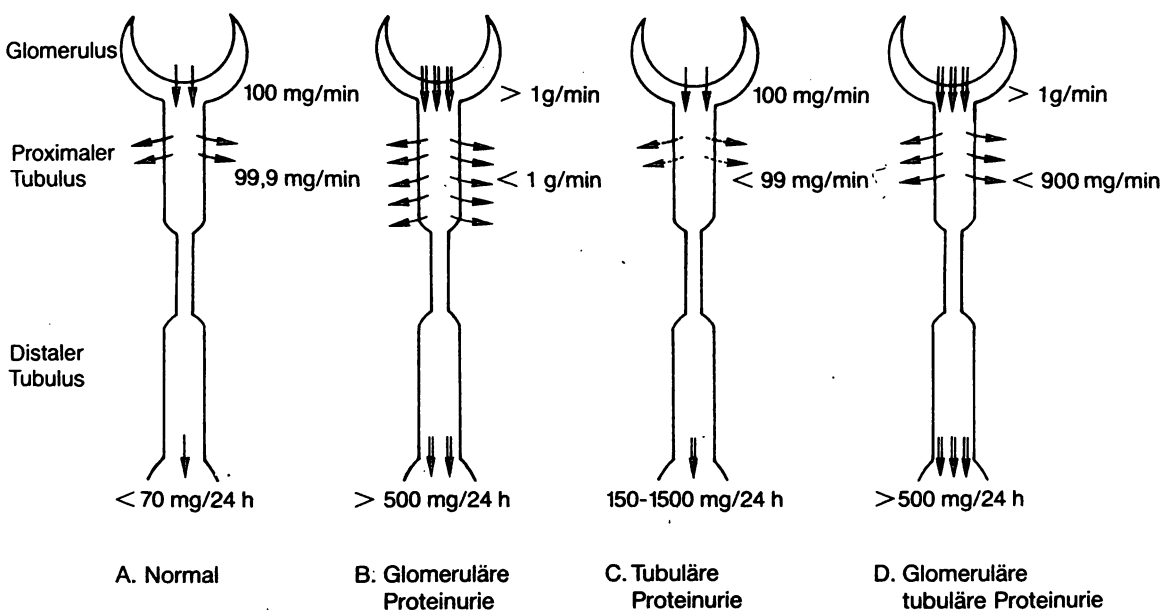


Abb. 1: Formen der Proteinurie. A: normaler Zustand; B: isoliert erhöhte Durchlässigkeit der glomerulären Basalmembran; C: isolierter Defekt der tubulären Proteinrückresorption; D: glomeruläre Proteinurie mit sekundärer Tubulusschädigung

Durch den Bezug auf g Creatinin (mmol Creatinin) wird die intraindividuelle Variabilität gegenüber dem Bezug auf das Volumen (l) verringert. Sie liegt für die Proteine zwischen 20 und 30% (mittlere Abweichungen in Prozent des Medians) (10). Auffallend ist die weit geringere Tag zu Tag-Schwankung für die N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (13%). Ein Grund scheint darin zu liegen, daß dieses Enzym im Rahmen der physiologischen Zellmauserung und Proteinresorption im proximalen Tubulus relativ konstant in den Urin abgegeben wird. Im Gegensatz hierzu ist die IgG-, Albumin- und  $\alpha_1$ -Mikroglobulin-Ekretion nicht nur von der Filtration und der tubulären Rückresorption, sondern auch von der Serumkonzentration abhängig.

## Klinische Anwendungsbeispiele

Aus unseren vorläufigen Erfahrungen möchten wir an drei Beispielen die klinische Anwendung verdeutlichen:

1. Verlaufskontrolle der diabetischen Nephropathie
2. Bence-Jones-Plasmozytom
3. akutes Nierenversagen.

### Verlaufskontrolle der diabetischen Nephropathie

Nach Mogensen teilt man die diabetische Nephropathie in fünf Stadien ein. Patienten im Stadium 1 sind durch Hyperfiltration, sonographisch vergrößerte Nieren und gelegentliche Mikroalbuminurie charakterisiert. Patienten im Stadium 2 weisen außer biotischen Veränderungen keine Urin- bzw. Serum-Veränderungen auf. Im Stadium 3, der beginnenden Nephropathie, findet man neben einer Mikroalbuminurie keine weiteren auffälligen

Veränderungen der Urin-/Serumkenngrößen. Stadium 4 zeichnet sich durch die persistierende Proteinurie und gleichzeitig erhöhte Serum- $\beta_2$ -Mikroglobulin- bzw.  $\alpha_1$ -Mikroglobulinkonzentration aus. Stadium 5 ist durch eine Niereninsuffizienz mit Serumcreatininerhöhung gekennzeichnet. Entsprechend dieser Klassifikation haben wir die Tag-zu-Tag-Verläufe von Typ I-Diabetikern im Stadium 1–4 untersucht. Zusätzlich sind wir den Fragen nachgegangen, ob die Proteinurie bei optimaler Blutglucoseeinstellung reversibel ist und wieviele Urine für eine sichere Stadienzuordnung notwendig sind.

Abb. 2 zeigt den Verlauf der Urinmeßgrößen bei einem Patienten im Stadium 1 der diabetischen Nephropathie. Auf der Abszisse haben wir die Zahl der Behandlungstage und auf der linken Ordinate die Kenngröße als Vielfaches der oberen Referenzbereichsgrenze dargestellt.

Durch Insulinbehandlung geht die mittlere Blutglucosekonzentration innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 250 mg/dl (Tag 1) auf 110 mg/dl (Tag 13) zurück. Entsprechend diesem Rückgang gehen die Urinkenngrößen N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase,  $\alpha_1$ -Mikroglobulin und Albumin (nur am ersten Tag liegt ein pathologischer Wert vor) im Beobachtungszeitraum auf Werte innerhalb des Referenzbereiches zurück. Dies zeigt, daß bereits im frühen Hyperfiltrationsstadium neben glomerulären auch funktionell tubuläre Veränderungen vorliegen.

Dem gegenüber zeigt ein Patient im Stadium 3 (Abb. 3) trotz verbesserter Stoffwechsellage keinen Rückgang der Urinkenngrößen. Die Ausgangswerte unterscheiden sich nicht von den ausgeschiedenen Konzentrationen nach 13 Untersuchungstagen. Es scheint eine gewisse „Fixierung“ eingetreten zu sein.

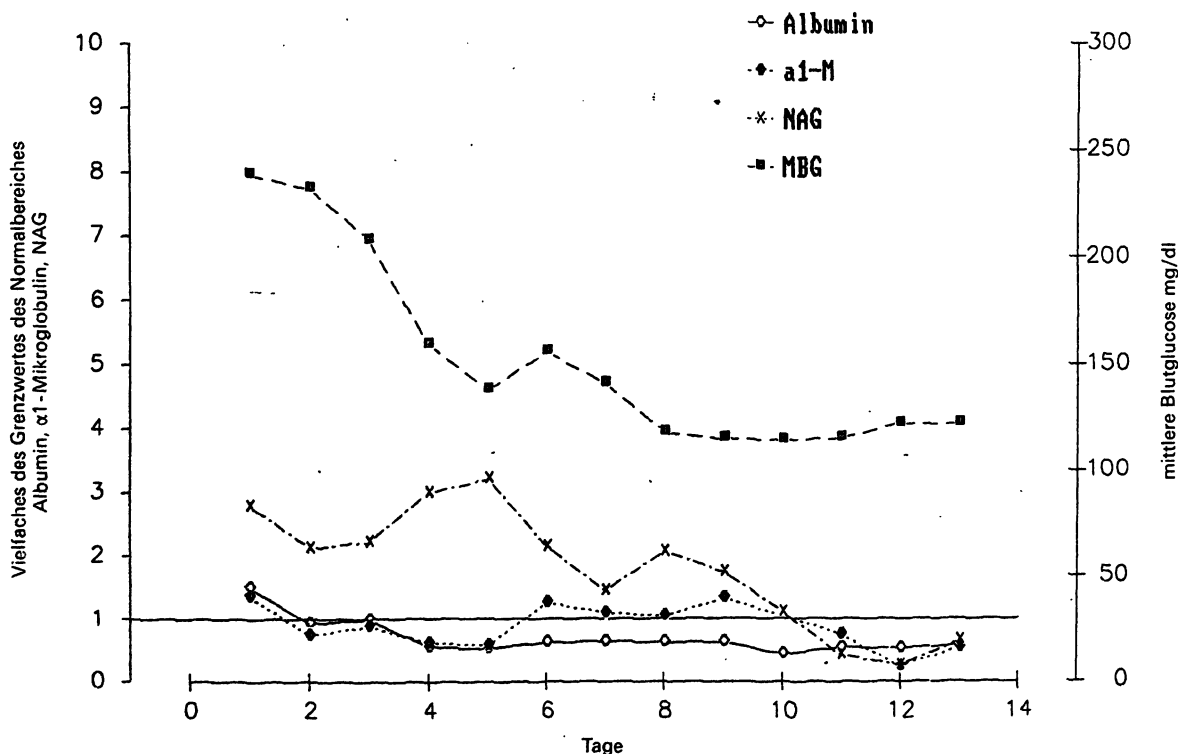


Abb. 2: Typ I-Diabetiker im Stadium 1 der diabetischen Nephropathie. Abszisse: Untersuchungstage; Ordinate links: Ausscheidung der Urinkenngrößen Albumin,  $\alpha_1$ -Mikroglobulin ( $\alpha_1$ -M) und N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG) als Vielfaches des Grenzwertes des Normalbereiches; Ordinate rechts: mittlere Blutglucose (MBG) in mg/dl. Die durchgezogene Linie (= 1,0) stellt die Normalbereichsgrenze der Kenngrößen dar

Bei einem Patienten im Stadium 4 (Abb.4), bei dem zusätzlich, als Ausdruck einer eingeschränkten glomerulären Filtration, die  $\alpha_1$ -Mikroglobulinkonzentration im Serum erhöht ist, liegt eine Albuminausscheidung bis zum

250fachen der oberen Referenzbereichsgrenze von 20 mg/g Creatinin vor. Eine Reversibilität ist trotz der verbesserten Stoffwechsellaage auch bei diesem Patienten nicht gegeben.

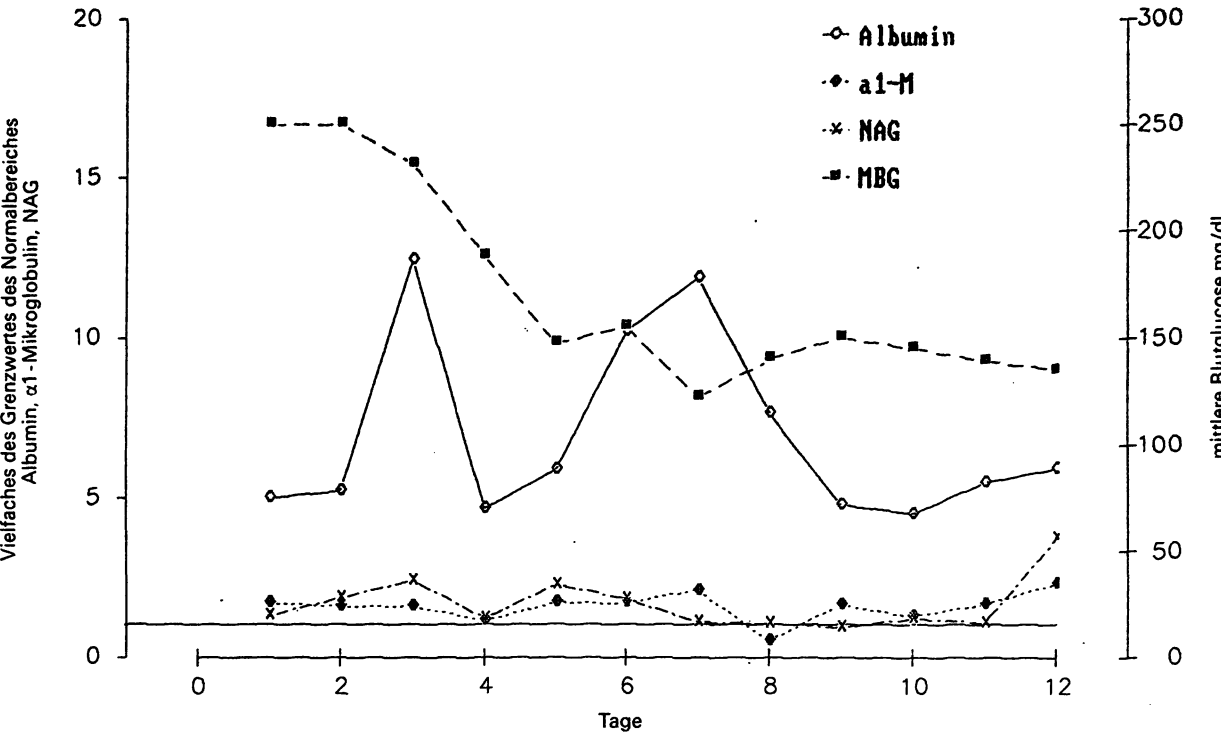


Abb. 3: Typ I-Diabetiker im Stadium 3 der diabetischen Nephropathie. Abszisse: Untersuchungstage; Ordinate links: Ausscheidung der Urinkenngrößen Albumin,  $\alpha_1$ -Mikroglobulin ( $\alpha_1$ -M) und N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG) als Vielfaches des Grenzwertes des Normalbereiches; Ordinate rechts: mittlere Blutglucose (MBG) in mg/dl. Die durchgezogene Linie (= 1,0) stellt die Normalbereichs-obergrenze der Kenngrößen dar

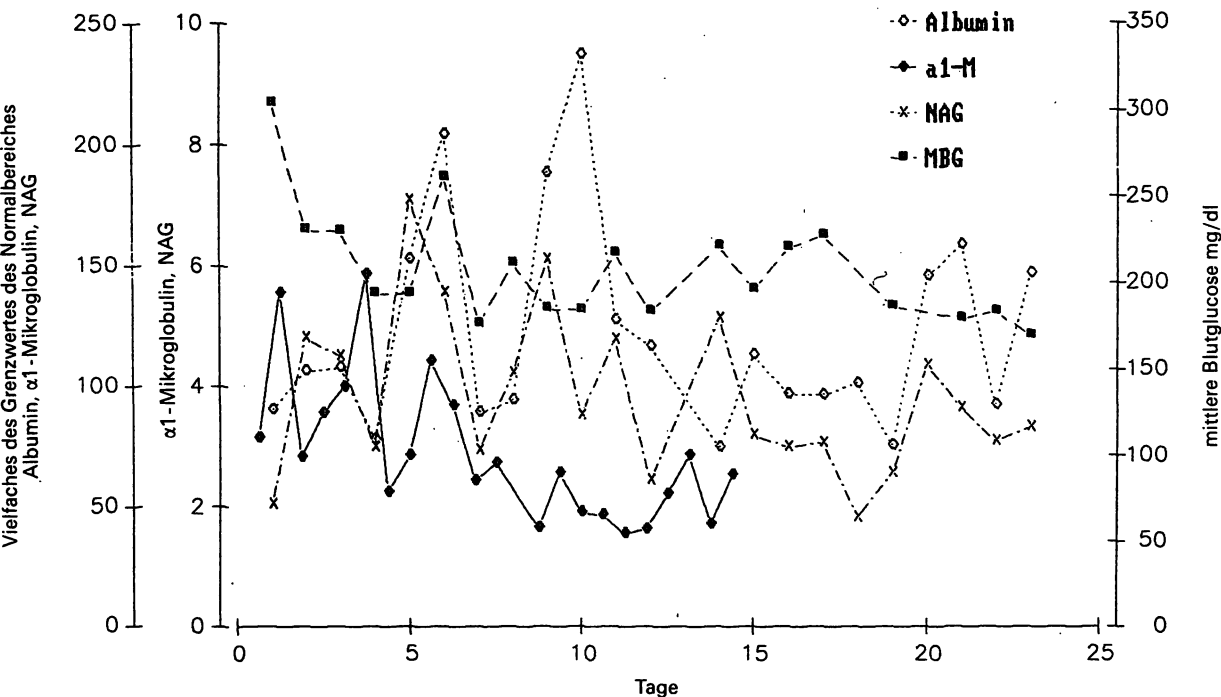


Abb. 4: Typ I-Diabetiker im Stadium 4 der diabetischen Nephropathie. Abszisse: Untersuchungstage; Ordinate links: Ausscheidung der Urinkenngrößen Albumin,  $\alpha_1$ -Mikroglobulin ( $\alpha_1$ -M) und N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG) als Vielfaches des Grenzwertes des Normalbereiches; Ordinate rechts: mittlere Blutglucose (MBG) in mg/dl

# Urineiweißdifferenzierung

An S KCl

München, den 9.06.89 9:45

Betr.:

geb. 11.11.11 HBNR 19705329

Sehr geehrte Frau Kollegin, sehr geehrter Herr Kollege!  
Für o.g. Pat. wurden unter der Auftrags-Nr. 600 vom 0.0.0  
folgende Laborwerte ermittelt:

	Meßwert	Einheit	Vorw. vor × Tagen	Normalwerte
Creatinin/Serum	0,9	mg/dl		0,7–1,2
A1-Mikroglob./S.	6,2	mg/dl		0,0–11,0

## Bezugsgrößen

Sammelmenge	950	ml		—
Sammelzeit	24	h (SZ)		—
Creatinin/Urin	0,9	g/l		—

## Teststreifen/Urin

Leukozyten im Urin	negativ
pH-Wert/Urin	5
Glucose im Urin	negativ
Eiweiß im Urin	negativ
Blut im Urin	negativ

## Urin-Eiweißdifferenzierung

Eiweiß/Urin	825	mg/l	—
Eiweiß/Urin/SZ	784 *	mg/SZ	0–70
IgG/Urin	3	mg/l	—
IgG/U./g Crea	3	mg/g Crea	0–10
Albumin/Urin	8	mg/l	—
Albumin/U./g Crea	9	mg/g Crea	0–20
Albumin-Prozent	1	%	—
A1-Mikroglob./U.	37	mg/l	—
A1-Mikroglob./U.	41,1 *	mg/g Crea	0,0–14,0
N-Acetylglucosamin	8,4	U/l	—
N-Acetylglucosamin	9,3 *	U/g Crea	0,0–5,0

## SDS-Elektrophorese

In der SDS-Gradientengelelektrophorese stellen sich neben einer schwachen Albuminbande bei 67 kD, je eine starke Bande bei 22 kD und 44 kD dar.  
Zusätzlich finden sich bei 33 kD (A1-Mikroglobulin) und 12 kD (B2-Mikroglobulin) je eine Bande.

## Beurteilung

In Übereinstimmung mit der SDS-Gradientengelelektrophorese weist die Erhöhung der tubulären Markerproteine (A1-Mikroglobulin und NAG) auf eine tubuläre Dysfunktion hin. Der auffällig niedrige Albuminanteil (1%) am Gesamteiweiß weist ebenfalls auf den tubulären Charakter der Proteinurie hin. Bei den in der SDS-Gradientengelelektrophorese dargestellten Proteinen bei 22 kD/44 kD handelt es sich um freie leichte Ketten (monomer/dimer). Es ergibt sich der Verdacht einer Bence-Jones-Proteinurie; Bestätigung und genaue Charakterisierung (Kappa, Lambda) erfolgen mit der Immunfixation.

Aus unseren Erfahrungen können wir ableiten, daß für eine klare Stadienzuordnung eine Untersuchung an jeweils drei unabhängigen Tagen notwendig ist (15).

#### Bence-Jones-Plasmozytom

Abb.5 zeigt einen Befundbericht, wie wir ihn bei der Anforderung „Urineiweißdifferenzierung“ erstellen. Neben den Serumkenngößen  $\alpha_1$ -Mikroglobulin und Creatinin führen wir eine Teststreifenuntersuchung und unser Urin-Untersuchungsprogramm durch.

Dieser Patient zeigte bei negativem Teststreifenergebnis eine Gesamteiweißausscheidung von 784 mg/24 Std. Die Differenzierung ergab eine unauffällige Albumin- und IgG-Ausscheidung. Der Albumin/Gesamteiweiß-Quotient lag bei 0,01. Dies diente als Hinweis auf eine atypische tubuläre Proteinurie. Als Ausdruck einer tubulären Dysfunktion waren die N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase- und  $\alpha_1$ -Mikroglobulinausscheidung stark erhöht. Zur weiteren Abklärung wurde eine SDS-Gradientengelelektrophorese durchgeführt. Es stellte sich neben einer schmalen Albuminbande je eine Bande bei 22 kD und bei 44 kD dar. Mittels der Immunfixation konnten diese

Proteine als leichte, freie Ketten Typ Lambda identifiziert werden (monomer 22 kD, dimer 44 kD).

#### Akutes Nierenversagen

In Abb.6 sind die Ergebnisse eines Intensivpatienten mit akutem Nierenversagen (ANV) denen eines ebenso schwer erkrankten Patienten ohne diese Komplikation gegenübergestellt.

Bei Intensivpatienten sind im Kontrollkollektiv die  $\alpha_1$ -Mikroglobulin-Ausscheidung und die N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase-Aktivität bis zum 10fachen der Referenzbereichsobergrenze erhöht. Der Patient mit ANV zeigt definitionsgemäß einen Serumcreatininanstieg von Tag 0 zu Tag 1 von größer als 0,5 mg/dl. Gleichzeitig ist die Serumcreatininkonzentration am Tag 1 größer als 1,5 mg/dl.  $\alpha_1$ -Mikroglobulin zeigt bereits Tage vor dem Serumcreatinanstieg eine 30fach erhöhte Ausscheidung und steigt am Tag +2 auf das ca. 40fache an. Für die N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase sehen wir am Tag +2 einen Anstieg auf das 20fache.

Diese massiv erhöhten tubulären Markerproteine weisen auf eine stark eingeschränkte tubuläre Rückresorption

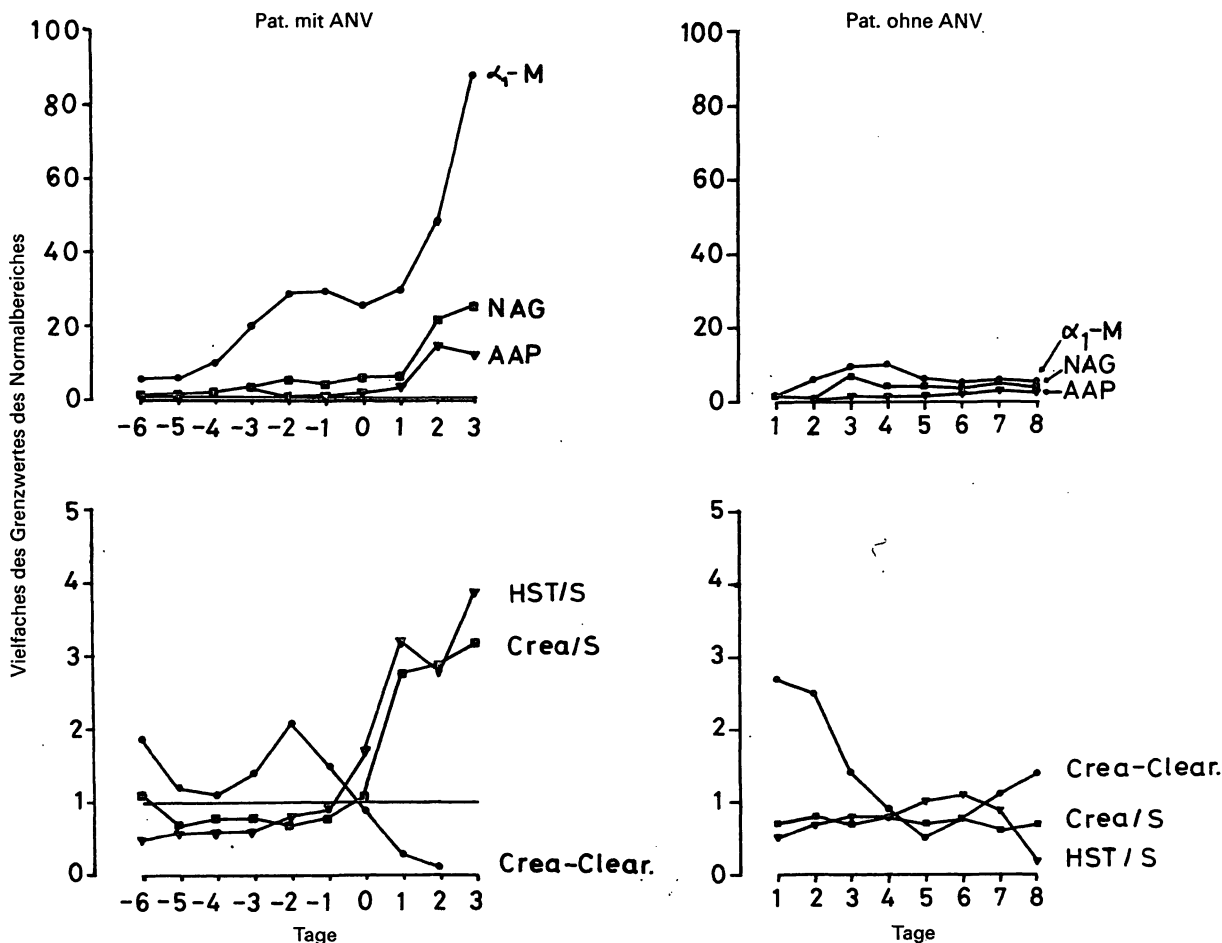
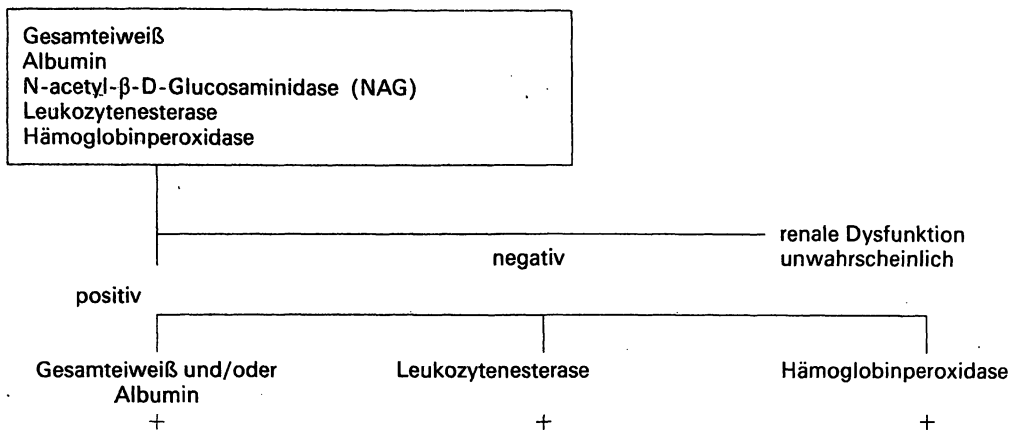
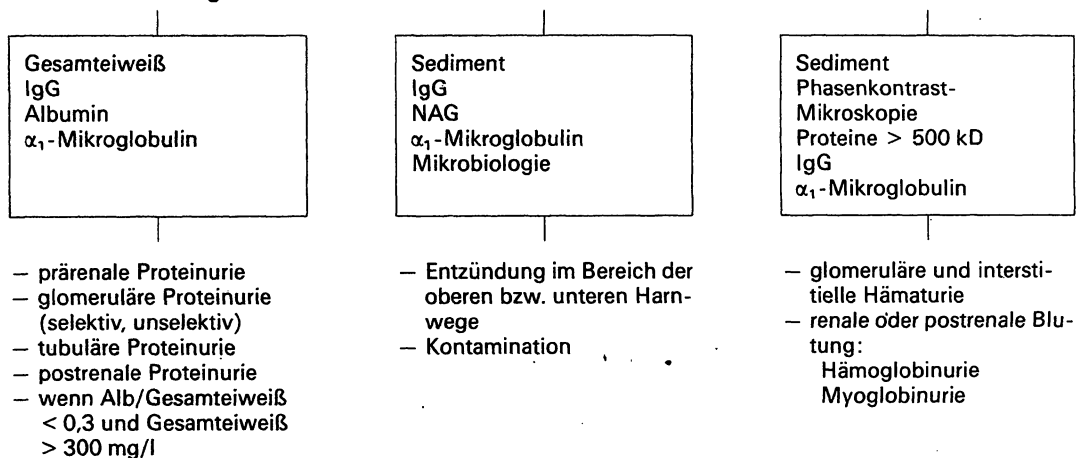


Abb.6: Intensivpatienten mit bzw. ohne akutes Nierenversagen (ANV). Abszisse: Untersuchungstage; Ordinate: Kenngrößen im Serum (S); HST/S = Harnstoff, Crea/S = Creatinin. Kenngrößen im Urin: AAP = Alaninaminopeptidase, NAG = N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase,  $\alpha_1$ -M =  $\alpha_1$ -Mikroglobulin, Crea-Clear = Creatinin clearance als Vielfaches des Grenzwertes des Normalbereiches. Die durchgezogene Linie (= 1,0) stellt die Normalbereichsobergrenze der Kenngrößen dar

## 1. Ausschluß



## 2. Differenzierung



## 3. Bestätigung

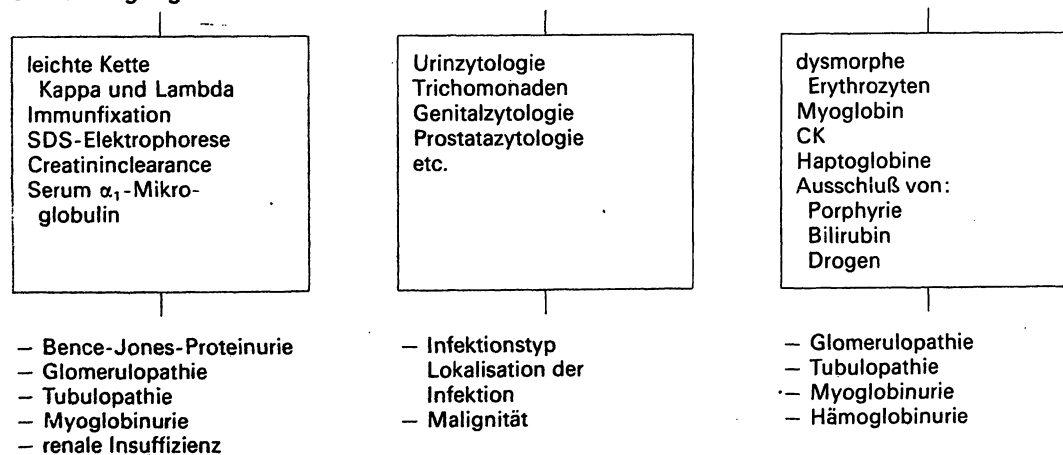


Abb. 7: Vorschlag zur Strategie der Harnanalytik zum Ausschluß und zur Differenzierung von Nierenerkrankungen



( $\alpha_1$ -Mikroglobulin) und Zellschädigung (N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase) im akuten Nierenversagen hin.

## Diskussion

Aus unseren bisherigen Erfahrungen möchten wir einen Strategieplan zur Diskussion stellen, der geeignet erscheint, sensitiv Nierenfunktionsstörungen auszuschließen beziehungsweise nachzuweisen (Abb. 7).

Wie wir aus einer Vielzahl von Untersuchungen gesehen haben, ist bei einer unauffälligen Uringesamteiweiß-, Albumin- bzw. N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase-Exkretion und gleichzeitig einem negativen Teststreifen auf Blut und Leukozyten eine renale Dysfunktion sehr unwahrscheinlich. Ist aber eine der Untersuchungen positiv, so sollte auf der Stufe der Differenzierung bei einer erhöhten Gesamteiweißausscheidung und gleichzeitig einer unauffälligen Albumin- und erhöhten  $\alpha_1$ -Mikroglobulin-ausscheidung der Verdacht einer möglichen Bence-Jones-Proteinurie abgeklärt werden.

Bei einem erhöhten Urinalbumin sollte geklärt werden, ob eine selektive/unselektive glomeruläre, tubuläre oder postrenale Proteinurie vorliegt (Programm Urineiweißdifferenzierung).

Bei einem positiven Esterasenachweis muß durch das Sediment bzw. die Urineiweißdifferenzierung die Frage einer Entzündung im Bereich der Niere oder der ableitenden Harnwege geklärt werden.

Liegt ein positives Testergebnis für Blut vor, so ist die Frage zu klären, ob es sich um eine renale oder postrenale Hämaturie handelt. Hier kann der Nachweis von Erythrozytenzylindern bzw. dysmorphen Erythrozyten zur Klärung beitragen (16).

Auf der Stufe der Diagnosesicherung sind Verfahren wie SDS-Elektrophorese, Immunfixation, cytologische Nachweise von spezifischen Erregern bzw. Serumkenngrößen zur Erfassung einer intravasalen Hämolyse (freies Hämoglobin erhöht, Hämopexin und Haptoglobin erniedrigt) sinnvoll. Bei Crush ist der spezifische Nachweis von Myoglobin im Urin bzw. die erhöhte Creatinkinase im Serum hinweisend.

Mit diesem vorläufigen Konzept möchten wir zeigen, daß sich die Forderungen nach einer differenzierten Proteinuriediagnostik durch Anwendung spezifischer Verfahren realisieren lassen. Für die nächsten Jahre bleiben jedoch noch viele Fragen zu klären. So müssen wegen der höheren Empfindlichkeiten erst die klinischen Entscheidungsgrenzen neu definiert werden. In Anbetracht fehlender

Verfahren zur Objektivierung dieser oft nur geringen Abweichungen wird dies sicher viele Jahre guter Zusammenarbeit zwischen Klinik und Labor bedürfen.

## Danksagung

Die beschriebenen klinischen Beispiele wurden in Zusammenarbeit mit den Kollegen der 3. Med. Abteilung (Leitung: Prof. Dr. K. D. Hepp) und der Abteilung für Anästhesiologie (Leitung: Prof. Dr. Landauer) des Städt. Krankenhauses München-Bogenhausen erarbeitet.

Für besonders qualifizierte technische Assistenz möchten wir uns sehr herzlich bei Frau Gisela Albert und Frau Gabriele Matschiner bedanken.

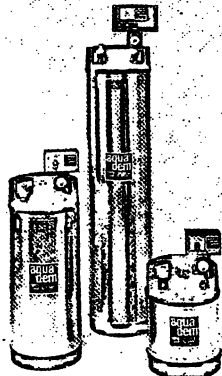
## Schrifttum:

1. GUDER, W. G.: Niere und ableitende Harnwege in: GREILING, H., GRESSNER, A. M. (Hrsg.): Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 1. Auflage, S. 563–604. Schattauer, Stuttgart, New York (1987).
2. MOGENSEN, C. E.: Hyperfiltration, Mikroalbuminurie und Hypertonie bei diabetischer Nierenschädigung. Akt. Endokr. Stoffw. 10, 47–54 (1989).
3. HASSLACHER, Ch.: Diagnostische Überwachung und Therapie in den Stadien der diabetischen Nierenerkrankung. Akt. Endokr. Stoffw. 10, 60–63 (1989).
4. FATEH-MOGHADAN, A., SCHMIDT, D., HOFMANN, W., GUDER, W. G.: Analysis of proteinuria in patients with multiple myeloma. (1989) (in Vorbereitung.)
5. LORENTZ, K., WEISS, T.: Proteinbestimmung im Urin – Eine kritische Übersicht. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 24, 309–323 (1986).
6. GUDER, W. G., HEIDLAND, A.: Urine analysis. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 24, 611–620 (1986).
7. KUTTER, D.: Schnelltests in der klinischen Diagnostik. 2. Aufl., Urban u. Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore (1983).
8. APPEL, W.: Qualitätssicherung in der Harnanalytik. In: VON BOROVICZENY, K. G., MERTEN, R., MERTEN, V. P. (Hrsg.): Qualitätssicherung im medizinischen Laboratorium. 1. Auflage, S. 487–548. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1987).
9. BOESKEN, W. H.: Die SDS-PAA-Elektrophorese der Urinproteine: Eine Methode zur Differentialdiagnose der Nephropathien und zur Analyse extrarenaler Proteinurien. Urologe 17, 140–144 (1977).
10. HOFMANN, W., GUDER, W. G.: A diagnostic program for quantitative analysis of proteinuria. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. (1989) im Druck.
11. HOFMANN, W., SCHMITZ-TREYER, U., GUDER, W. G.: Bestimmung von IgG, Albumin,  $\alpha_1$ -Mikroglobulin und Retinol-bindendem Protein im Urin mit dem Behring-Nephelometer Analyser (BNA). Lab. med. (1989) eingereicht.
12. HOFMANN, W.: Erste Erfahrungen mit der nephelometrischen Bestimmung von Einzelproteinen im Urin und ihrer diagnostischen Anwendung an ausgewählten Beispielen. In: FATEH-MOGHADAN, A. (Hrsg.): „Nephelometrie Symposium“ Bad Nauheim (1987) S. 89–105. Behring (1989).
13. GOREN, M. P., WRIGHT, R. K., HOROWITZ, M. E.: Cumulative renal tubular damage assoziiert with cisplatin nephrotoxicity. Cancer. Chemother. Pharmacol. 18, 69–73 (1986).
14. PRICE, R.: Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. Toxicology 23, 99–134 (1982).
15. PALECEK, I.: Reversibilität der Proteinurie und Enzymurie bei Insulintherapie in Abhängigkeit von der Qualität der Stoffwechseleinstellung bei Typ 1 und Typ 2 Diabetikern. Dissertation (1989).
16. MANN, J., RITZ, E.: Rationelle Diagnostik der Hämaturie. Dt. Med. Wchschr. 34, 1306–1309 (1987).

## Anschrift der Verfasser:

Dr. W. Hofmann  
Prof. Dr. W. G. Guder  
Institut für Klinische Chemie  
Städt. Krankenhaus München-Bogenhausen  
Englschalkinger Straße 77  
8000 München 81

**Reines  
entsalztes Wasser  
preiswert  
selbst herstellen:  
Mit  
AQUADEM®-  
Patronen-  
entsalzungs-  
geräten**



**In Sekundenschnelle destillat-  
gleiches entsalztes Wasser.  
Leistung zwischen 100 und  
1000 l/h. Hoher Bedienungs-  
komfort. Z.B. Meßelektrode  
beschädigungsfrei im Behälter-  
verschluß untergebracht.  
Patronen in druckloser und  
druckfester Ausführung.  
Erhebliche Kostenersparnis  
durch das AQUADEM Refill-  
System! Harzumfüllung im  
eigenen Haus.  
Wir planen, liefern und mon-  
tieren maßgeschneiderte und  
ausbaufähige Systeme jeder  
Art und Größe für die Reinst-  
wassergewinnung.**

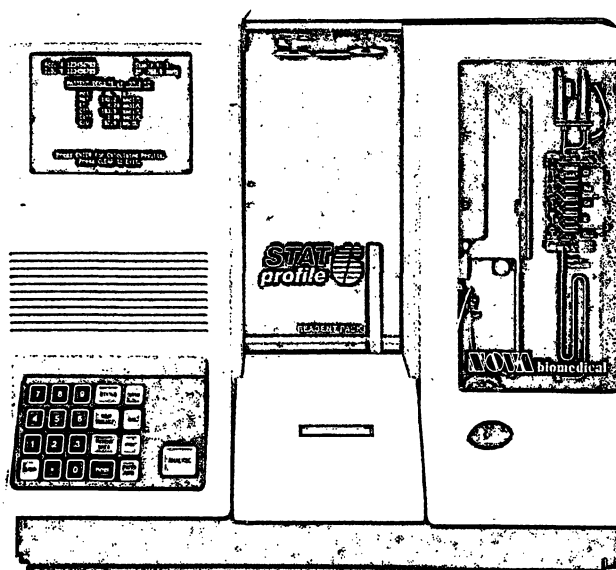
**Bitte fordern Sie ausführliche  
Informationen an!**

**wilhelm  
werner  
gmbh**

Buchholzstr. 73 • 5060 Berg-Gladbach 2  
Telefon 02202/51054

# STAT Profile, der neue Status im Akutlabor

Glucose, Hämatokrit, Blutgase und ...



- 38 Proben/Stunde
- 250  $\mu$ l Blut
- 10 Sek. Meßzeit
- 9 Meßwerte
- 22 Parameter
- Hämoglobin
- Osmolalität
- 11 Blutgas-Rechenwerte

## STAT-Profile Systeme

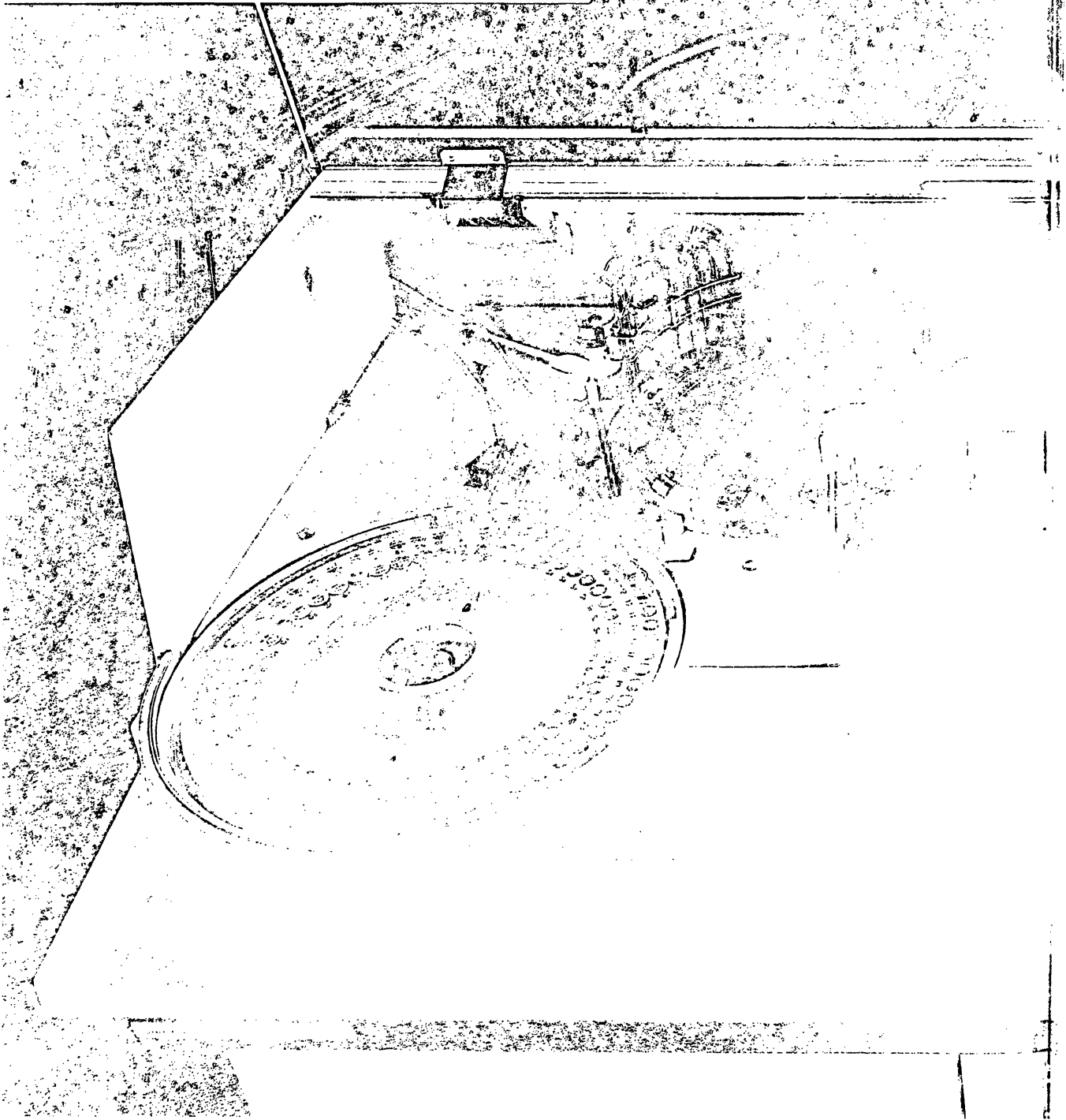
Alle STAT Profile sind ausbaufähig; auch für zukünftige Parameter

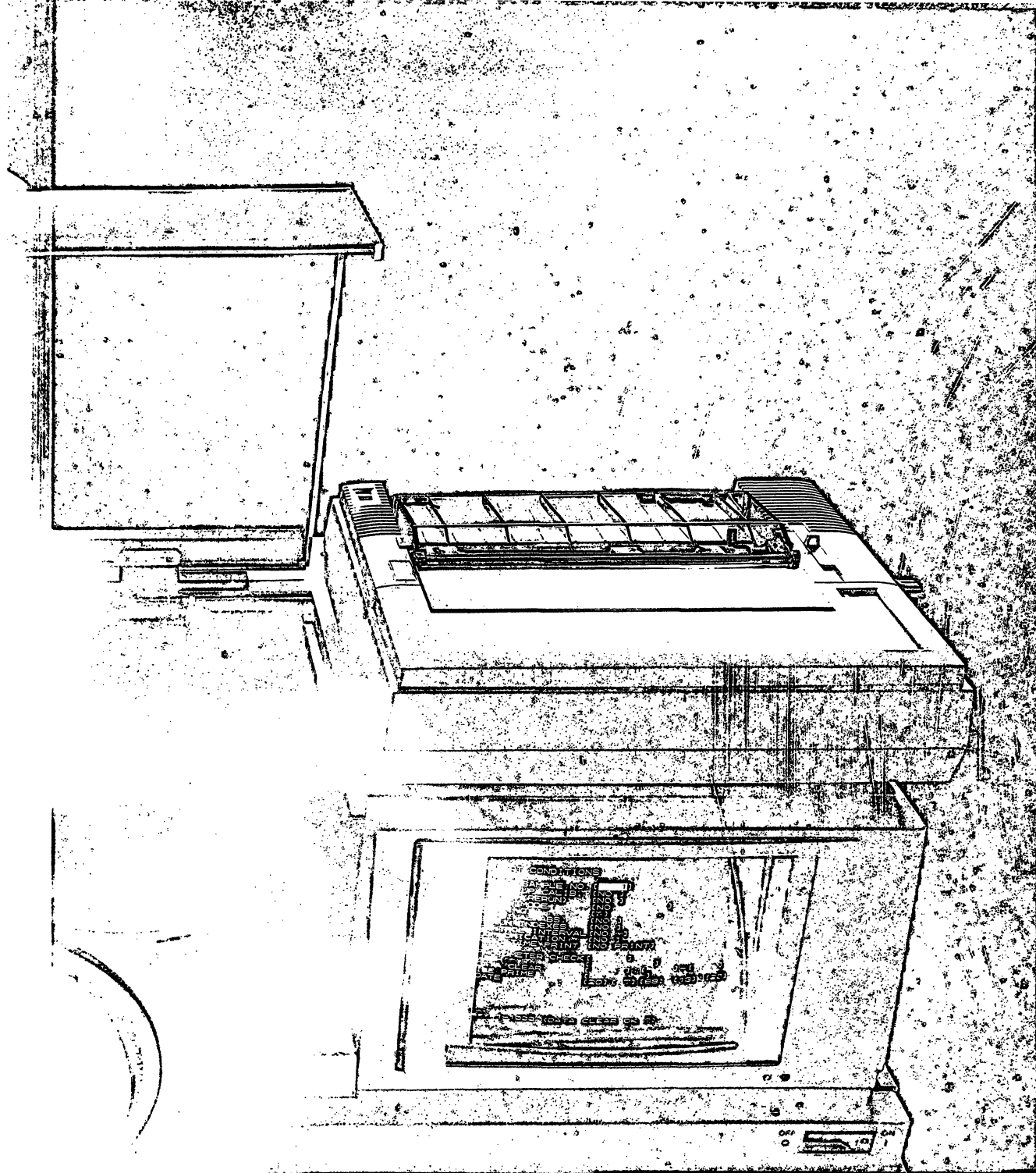
				GLU	GLU
				Cl	Cl
				Ca	Ca
				Na	Na
pH PCO <sub>2</sub> PO <sub>2</sub>	Na	Na	Na	K	K
	K	K	K	HK	HK
	HK	HK	HK	HK	HK
	HK	HK	HK	HK	HK
pH	pH	pH	pH	pH	
PCO <sub>2</sub>	PCO <sub>2</sub>	PCO <sub>2</sub>	PCO <sub>2</sub>	PCO <sub>2</sub>	
PO <sub>2</sub>	PO <sub>2</sub>	PO <sub>2</sub>	PO <sub>2</sub>	PO <sub>2</sub>	
STAT 3	STAT 2	STAT 1	STAT 4	STAT 5	STAT 6

**NOVA**  
biomedical

NOVA BIOMEDICAL GMBH  
Adam-Opel-Straße 19a  
6074 Rödermark  
Telefon 0 60 74 / 5 00 21

*Erfolg kommt  
nicht von  
Gefähr...*





*...über 1000 BM/Hitachi Analysensysteme  
in Deutschland sind ein beredtes Zeugnis.*



Boehringer Mannheim GmbH  
6800 Mannheim 31

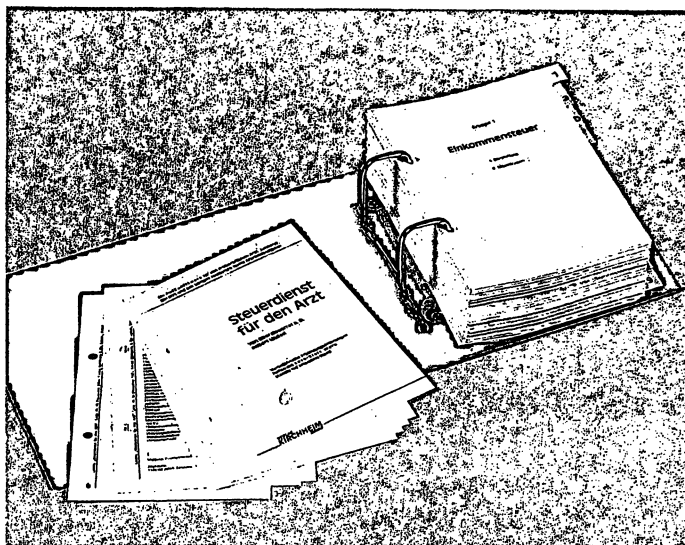
# Steuerdienst für den Arzt

Die für den Arzt einschlägigen Urteile finden Sie – nach Stichworten geordnet – in dem Loseblattwerk von Obersteuerrat Robert Linden.

Das Werk enthält u. a. die statistischen Kostensätze der Ärzte aller Fachrichtungen sowie Testbögen, die eine genaue Kostenanalyse der Praxis ermöglichen. Der Rationalisierung Ihrer Praxis dient das ausführliche „ABC der abzugsfähigen Ausgaben bei der Einkommensteuer“.

## Hand aufs Herz

- \* Verschenken Sie nicht auch Jahr für Jahr viel Geld an das Finanzamt?
- \* Nehmen Sie alle legalen Steuerminderungsmöglichkeiten in Anspruch?
- \* Stellen Sie rechtzeitig die notwendigen Anträge?
- \* Haben Sie Zeit und Gelegenheit, sich über Ihre berufsspezifischen Steuerfragen in den Steuerfachzeitschriften zu orientieren?
- \* Verlassen Sie sich ganz auf Ihren Berater?
- \* Haben Sie schon einmal einen Praxiskostentest gemacht?
- \* Wissen Sie, ob Sie mehr oder weniger als Ihre vergleichbaren Kollegen verdienen?



**VERLAG  
KIRCHHEIM  
MAINZ** Postfach 25 24, 6500 Mainz 1

Hiermit bestelle ich ein Grundwerk „**Steuerdienst für den Arzt**“ zum Preis von 79,80 DM und die künftig vierteljährlich erscheinenden Ergänzungslieferungen zum Seitenpreis von –,37 DM.

Sie garantieren mir, daß ich diese Bestellung binnen einer Frist von einer Woche schriftlich widerrufen kann. Der Widerruf ist an den Verlag Kirchheim, Postfach 25 24, 6500 Mainz, zu richten. Zur Wahrung der Frist genügt die rechtzeitige Absendung des Widerrufs.

Anschrift:

Name: \_\_\_\_\_

Straße: \_\_\_\_\_

PLZ/Ort: \_\_\_\_\_

Datum/Unterschrift: \_\_\_\_\_

Datum

Unterschrift

# Radioimmunoassay versus nicht-radioisotopischer Immunoassay 1989. Pro und contra

Eine Gegenüberstellung verschiedener Methoden \*

## Radioimmunoassay versus Non-radio isotopic immunoassay 1989. Pro and contra

W. G. Wood

Klinische Laboratorien, Klinik für Innere Medizin, Medizinische Universität zu Lübeck

### Zusammenfassung:

*Dieser Artikel beschreibt den jetzigen Zustand der radioisotopisch- und nicht-radioisotopisch markierten Immunoassays. Nach einer kurzen Einleitung, in der die verschiedenen Methoden vorgestellt werden, werden die Enzym-, Fluoreszenz- und Lumineszenzimmunoassays mit ihren Vor- und Nachteilen im einzelnen besprochen. Am Schluß werden die Zukunftsperspektiven der verschiedenen Immunoassaytypen, zusammen mit einem „universell einsetzbaren“ Immunoassaysystem unter Verwendung von Streptavidin-Biotin-Reagenzien, erwähnt.*

### Schlüsselwörter:

*Immunoassay – Radioisotopen – Enzymmarkierungen – Fluoreszenzmarkierungen – Lumineszenzmarkierungen – Streptavidin-Biotin*

### Summary:

*This article describes the present situation of the immunoassay sector, in terms of radioisotope and non-radioisotope labelling. After a short introduction, in which the different methods are presented, the advantages and disadvantages of enzymes, fluorogens and luminogens are discussed as alternatives to radioisotopes. Finally the future of immunoassays is discussed together with a brief description of a universally applicable assay system in which streptavidin-biotin reagents are used.*

### Keywords:

*Immunoassay – radioisotopic labels – enzyme labels – fluorogenic labels – luminogenic labels – streptavidin-biotin*

## Einführung

Seit 30 Jahren kennen wir den Radioimmunoassay (1) und es wäre jetzt unvorstellbar, wenn wir im Labor auf ihn verzichten müßten. Es gibt kaum eine Methode, die so einen Einfluß auf das Laborleben gehabt hat. Es ist mit ihm möglich, in Bereiche zu gelangen, wo man sich die erreichbaren Konzentrationen nur als Zahlen, aber nicht mehr als Mengen vorstellen kann. Seit etwa 20 Jahren sucht man alternative Markierungssubstanzen, die die Radionuklide ersetzen sollen. Obwohl Enzym-, Fluorogen- und Luminogenmarkierungen in den 70er Jahren beschrieben worden sind (2–5) und einige eifrige Wissenschaftler schon damals dem Radioimmunoassay den Tod voraussagten, ist der „RIA“ heute genau so aktuell wie vor 20 Jahren!

Es ist nur mit der Einführung von robusten (stabilen) Methoden (5–7) möglich gewesen, an alternative Markierungssubstanzen für Immunoassays zu denken. So sind nunmehr während der 80er Jahre einige nicht-radioisotopisch markierte Immunoassays nicht nur in For-

schungslabors, sondern auch als „Kits“ erhältlich. Das Zeitalter der „Alternativen zum RIA“ war angebrochen. Wie sind diese neuen Methoden? Können sie den RIA ersetzen oder gibt es immer noch Mißverständnisse in der Anwendung? In diesem kurzen Ausflug in das Reich des Immunoassays werden einige Markierungen und Methoden beschrieben und mit dem „Goldenen-Standard-RIA“ verglichen. Die Vor- und Nachteile der radioisotopisch markierten Immunoassays sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: RIA/IRMA, Vorteile und Nachteile

Vorteile	Nachteile
a) Moleküle wenig verändert, z. B. $^{125}\text{I}$ anstatt $^{127}\text{I}$	a) Strahlungsgefahr
b) Signal direkt meßbar	b) Zerfall nicht steuerbar
c) Messung wiederholbar	c) Isotopenreinheit
d) Breiter Meßbereich	d) Neue Elemente entstehen ( $^{125}\text{I}$ zu $^{125}\text{Te}$ , Gr. VIIb zu Gr. VIb)
	e) Radiolyse
	f) Kurze Haltbarkeit der markierten Verbindungen

\* Vortrag März 1989 in Lemgo, 3. Norddeutsche Laborgesprache.

## Alternative Markierungen

Markersubstanzen, die schon beschrieben wurden, sind u.a. Enzyme (2), Fluorogene (8), Luminogene (9, 10) und Kombinationen von diesen. In diesem Artikel werden diese Markersubstanzen näher betrachtet. Ohne Markierung funktionierende Nephelometrie wird hier nicht berücksichtigt.

### 1. Enzyme

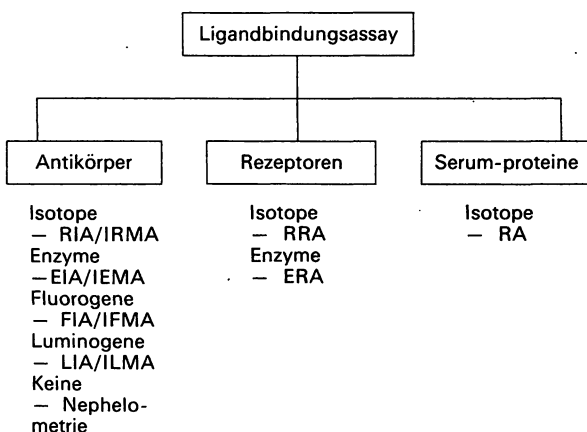
Die ersten alternativen Substanzen, die als Signalträger dienten, waren Enzyme. Gleichzeitig kam eine neue Spielregel, die für den RIA nicht galt, „das Patent“. Innerhalb weniger Jahre wurden Verfahren zur Patentanmeldung angefertigt. So kam z.B. das homogene Enzymimmunoassaysystem von Merck-Syva, das EMIT (enzymverstärkte Immunoassaytechnik) Verfahren auf den Markt. Hier war es möglich, ohne Trennung, durch Aktivierung bzw. Inaktivierung des Enzyms durch die Antigen-Antikörper-Reaktion eine analyseabhängige Signaländerung herbeizuführen (11).

Der Vorteil war ein Assay ohne Trennschritt: ein Gewinn gegenüber dem RIA-Verfahren. Die Nachteile wurden aber auch bald sichtbar, z.B. Störung durch Serumkomponenten, relativ unempfindliche Assays (Konzentrationen im µg/l- bis mg/l-Bereich) und nur bestimmte Antikörper besaßen die Eigenschaft, die Enzymaktivität durch Antigenbindung zu beeinflussen. Ungefähr gleichzeitig trat eine andere Assayart auf, der ELISA (enzymverbundener Immunosorbens Assay) (5). Ein Name, der, nach Meinung des Autors, alles und gar nichts aussagt, aber einen schönen Klang besitzt. Das Zeitalter der „Mädchennamen“-Assays wurde mit ELISA eingeleitet. Bald gab es auch IRMA, ILMA, CELIA, LUCIA, um nur ein paar Namen zu nennen!

Unter ELISA werden viele verschiedene Methoden vorgestellt, so daß eine einheitliche Nomenklatur im Immunoassay immer noch dringend nötig ist. Tab.2 versucht eine einheitliche Nomenklatur zu erstellen. Diese Tabelle entstand schon 1981 (12), aber der Immunoassay-Turm zu Babel steht immer noch, er wird sogar weiter ausgebaut!

Der ELISA aber brachte die wichtige Erkenntnis, daß ein Reaktionspartner (normalerweise der Antikörper) an eine

Tab.2: Ligandbindungassays (Competitive Protein Binding Assays)



festen Phase gebunden sein muß, um eine Eliminierung der unspezifischen Reaktionen (Störsubstanzen) vor dem Meßschritt herbeizuführen.

Fast alle nicht-radioisotopischen Methoden, die erfolgreich sind, basieren auf der Festphasentechnologie. Mit geeigneter Festphase ist die Trennung von gebundenen und freien Komponenten leicht durchzuführen. Mit beschichteten Röhrchen braucht man den Inhalt nur abzusaugen, mit Wasser oder Puffer zu waschen, und schon ist die Trennung (ohne Zentrifuge) komplett!

Welche Enzyme kommen in Frage für Enzymimmunoassays? Für die homogenen Assays werden oft Dehydrogenasen (Malatdehydrogenase, Glucose-6-Phosphatdehydrogenase) benutzt. Für Festphasenassays werden Peroxidasen (Meerrettichperoxidase), alkalische Phosphatase und  $\beta$ -Galactosidase bevorzugt, obwohl „Exotika“, z.B. Penicillinase (13) auch vorkommen.

Jedes Enzym besitzt seine Vor- und Nachteile:

Peroxidase hat eine hohe Umsatzrate, ist aber gegen herkömmliche antimikrobielle Agenzien wie Azid oder Methylthiolat „empfindlich“. Die Substrate der Peroxidase sind oft karzinogen, z.B. o-Phenylendiamin, die Farbstoffe instabil. Alkalische Phosphatase dagegen gilt als robust. Diese ist „immun“ gegen Azid, reagiert aber empfindlich auf Phosphat (Produkthemmung) und EDTA ( $Zn^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  sind für die Enzymaktivität notwendig).

$\beta$ -Galactosidase wird nicht oft verwendet, weil ihre Umsatzrate relativ niedrig ist. Sie wird aber in „Zwitterassays“ verwendet, d.h. mit fluorogenen Substraten wie 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactosid, so daß hier ein fluoreszenzverstärkter Enzymimmunoassay entsteht.

Andere Kombinationen sind Peroxidase mit Luminol-peroxid-4-iodphenol, die in einem lumineszenzverstärkten Enzymimmunoassay eingesetzt werden (3). Assays, die auf diesem Prinzip basieren, werden von Amersham International vertrieben.

Es darf aber nicht vergessen werden, daß Enzymimmunoassays mit Farbreaktionen dem Lambert-Beerschen Gesetz unterliegen. Die daraus resultierenden Schwierigkeiten können mit Hilfe einer „trichromatischen Messung“ zum Teil umgangen werden. Hier wird bei zwei spezifischen Wellenlängen und einer Referenzwellenlänge gemessen. Wenn die optische Dichte beim Hauptgipfel über ca. 1,5 steigt, kann man auf einer „Schulter“ oder einem zweiten Gipfel messen, so daß man im Endeffekt eine „relative OD“ von 6 leicht erreichen kann. Dieses Prinzip wird von einem Kit-Hersteller für seine Enzymimmunoassays (Serono) schon mit Erfolg benutzt.

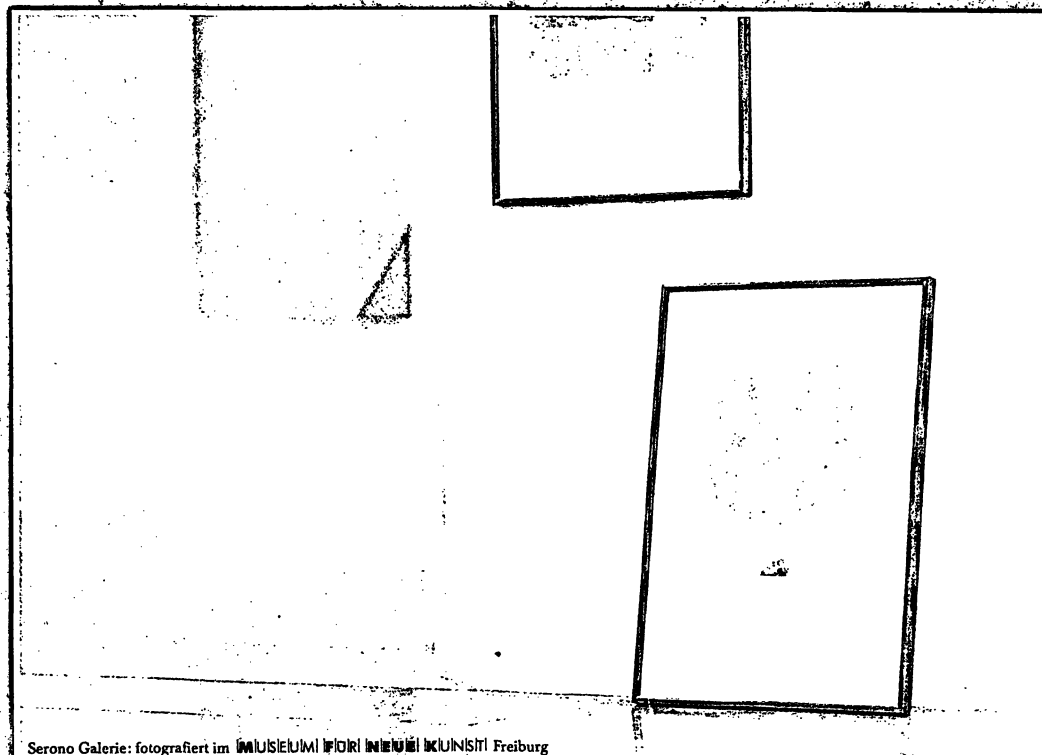
Ein Nachteil des Enzymimmunoassays ist mit diesem Schritt aus dem Weg geräumt. Der größte Nachteil vom Enzymimmunoassay ist allerdings die relativ hohe Zahl der Inkubations- und Waschschritte, die nötig sind. Vollautomaten können diese für MTA's oft als lästig empfundene Prozedur erledigen. Als Gegenleistung muß aber oft Arbeit mit einem computerunterstützten System in Kauf genommen werden. Solche „Arbeitspferde“ sind in den ES 600/ES 300-Systemen von Boehringer Mannheim zu sehen.

Tab.3 zeigt die Vor- und Nachteile von Enzymimmunoassays gegenüber Assays mit Radionuklid-Markierungen.

### 2. Fluorogene Substanzen

Der Begriff Fluoreszenzimmunoassay (FIA) beruht auf drei verschiedenen Prinzipien, die in der in-vitro-Diagnose

# SEROZYME GALERIE MODERNER PERFEKTION.



Serono Galerie: fotografiert im MUSEUM FÜR NEUE KUNST Freiburg

## Immunoassays von Serono Diagnostika.

**Fruchtbarkeits-  
diagnostik**

**H-SEROZYME**  
**FSH-SEROZYME**  
**Progesteron-SEROZYME**  
**Prolaktin-SEROZYME**

**Schwangerschafts-  
überwachung**

**AFP-SEROZYME**  
**HCG-SEROZYME**  
**NEU: Estriol-SEROZYME**

**Schilddrüsen-  
diagnostik**

**TSH-SEROZYME**  
**T3-SEROZYME**  
**T4-SEROZYME**  
**T3-Uptake-SEROZYME**

**Tumordiagnostik/  
Tumornachsorge**

**AFP-SEROZYME**  
**CEA-SEROZYME**  
**HCG-SEROZYME**

**Stoffwechsel/  
Verschiedenes**

**NEU:**  
**Cortisol-SEROZYME**  
**Digitoxin-SEROZYME**  
**Digoxin-SEROZYME**  
**Ferritin-SEROZYME**  
**Gesamt-IgE-SEROZYME**

**Serono**  
DIAGNOSTICS

**Erfahrung schafft Fortschritt®**

**Deutschland:**  
Serono Diagnostika GmbH  
Krausener Str. 134, D-7800 Freiburg  
Telefon (0761) 401 67-0

**Österreich:**  
Serono Diagnostika GmbH  
Innationsburg Wien  
Herrengasse 13, A-1160 Wien  
Telefon (0222) 82 03 78

Ich bitte um Informationen zu:

Name

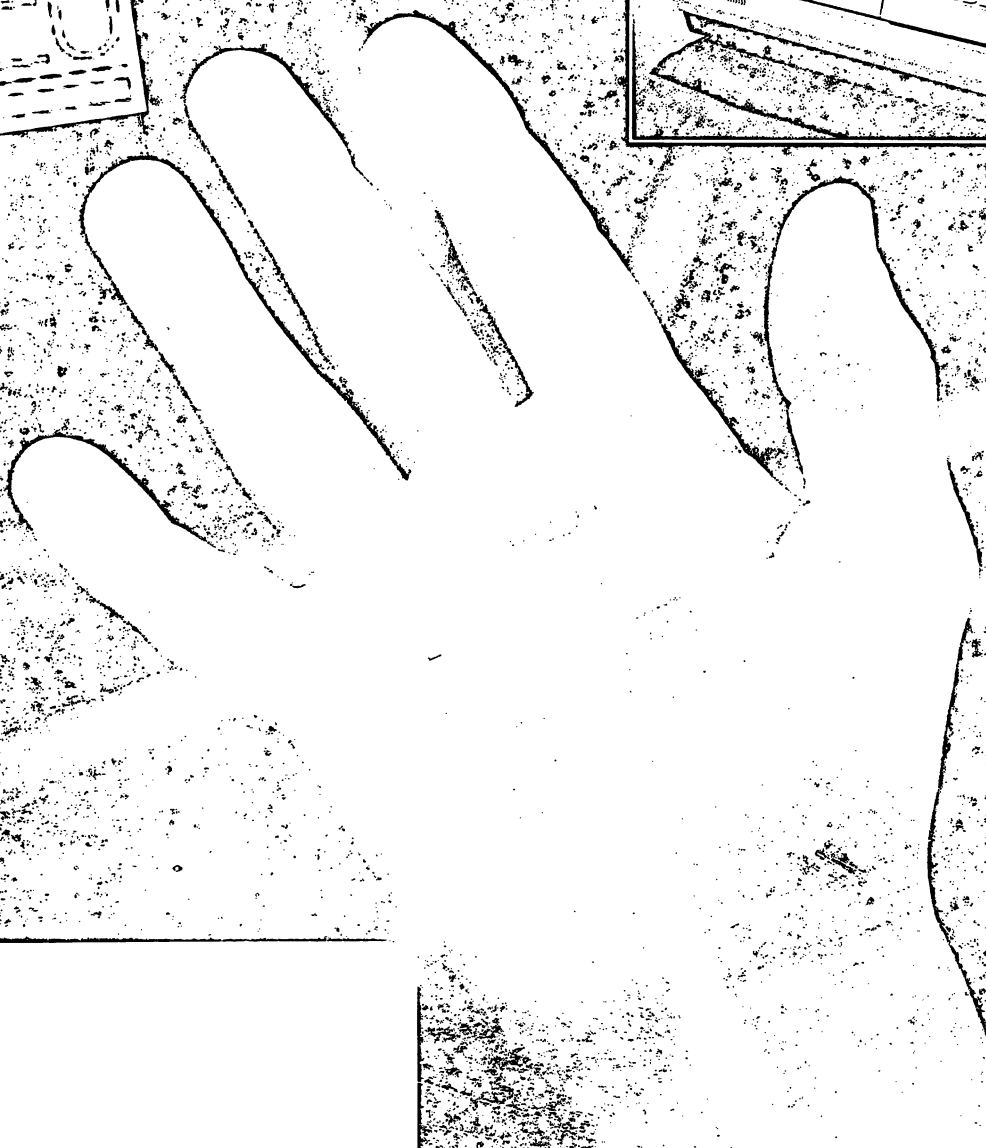
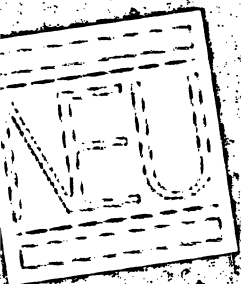
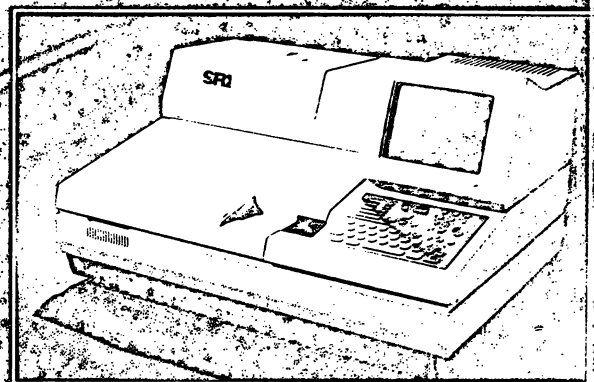
Institut



# Das Ergebnis unserer Erfahrung ist Fortschritt in Ihrer Hand

# SERO

Das vollautomatische  
Enzymimmunoassay (EIA) Testsystem  
für Serien- und Selektivanalyse!



**Serono**  
DIAGNOSTICA

**Erfahrung  
schafft  
Fortschritt®**

**In Deutschland:**  
Serono Diagnostica  
Merzhauser Straße  
D-7800 Freiburg  
Tel-Zentrale (0761) 1111

**In Österreich:**  
Serono Diagnostica  
Informationsbüro  
Diesterweggasse 1  
A-1140 Wien  
Telefon (0222) 820 1111

Tab. 3: Alternative Markierungen (Enzymimmunoassays)

Vorteile	Nachteile
a) Keine Radioaktivität	a) Große Moleküle (POD – 40 kD, AP – 100 kD)
b) Verstärkung durch enzymatische Reaktionen	b) Änderung der antigenen Eigenschaften
c) Microtiterplattenassays möglich	c) Enzyme oft „anfällig“, POD durch Azid, Hg, AP durch EDTA
d) Breiter Meßbereich durch trichromatische Messung möglich	

stik angewendet werden. Die konventionelle Fluoreszenz, d.h. Anregung mit einer Licht-Wellenlänge  $\lambda_1$ , Messung der Fluoreszenz-Wellenlänge  $\lambda_2$  beim 90°-Winkel, wird nur in fluoreszenzverstärkten Enzymimmunoassays verwendet (z. B. Stratus-System von Baxter).

Die Empfindlichkeit dieses Systems ist durch die Enzymverstärkung vergleichbar mit dem RIA/IRMA.

Die Polarisationsfluoreszenz (8) wird im ABBOTT TDx angewendet. Hier wird die Rotationsenergie zwischen gebundenem und freiem Antigen ausgenutzt. Man braucht eine perfekt eingestellte und ausgefeilte Elektronik, um dieses Prinzip durchzuführen, d.h. mit einer manuellen Technik ist der Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay (FPIA) nicht möglich. Es limitiert sich meistens auf kleine Moleküle, die in relativ hohen Konzentrationen ( $\mu\text{g/l}$  bis  $\text{mg/l}$ ) vorkommen. Deshalb eignet sich dieses System für die Medikamentenspiegelüberwachung.

Die dritte Fluoreszenzart ist die „zeitverzögerte Fluoreszenz“ seltener Erden, z. B. von Europium, Terbium, Gadolinium und Samarium. Dieses Phänomen wurde schon 1940 beschrieben (14), obwohl seine Anwendung in „Time Resolved Fluorescence Immunoassays (TRFIA)“ erst seit etwa 10 Jahren durch Einsatz modernster elektronischer Meßmethoden erfolgreich als „RIA-Konkurrent“ auftritt (15, 16). TRFIA-Systeme werden von Pharmacia Wallac und Cyber-Fluor angeboten. Die Empfindlichkeit dieser Systeme übertrifft die Empfindlichkeit vom RIA/IRMA, so daß hier eine richtige „Alternative zum Radioimmunoassay“ auf allen Gebieten angeboten wird. Die Fluoreszenz der oben genannten Elemente, z. B.  $\text{Eu}^{3+}$ , klingt erst nach einigen Millisekunden (im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenz mit einer Abklingzeit von wenigen Nanosekunden) vollständig ab. Die „Stokes'sche Verschiebung“ (Unterschied zwischen Anregungswellenlänge und Fluoreszenzwellenlänge) beträgt knapp 300 nm (vergl. Fluorescein-Fluoreszenz < 50 nm). Zusammen geben diese Eigenschaften dem TRFIA seine Attraktivität.

Tab. 4 zeigt die Vor- und Nachteile der Fluoreszenz.

### 3. Lumineszenz

Eine dritte Alternative zur radioisotopischen Markierung bietet die Lumineszenz. Es gibt zwei Arten von Lumineszenz, und zwar die Biolumineszenz und die Chemilumineszenz, die den Ursprung der Lichtreaktion hervorheben.

Dieses Prinzip der Lichterzeugung scheint in beiden Fällen gleich zu sein. In Immunoassays wird die Chemilumineszenz wegen der hohen Reagenzien-Stabilität angewendet (9, 10).

Im Gegensatz zur Fluoreszenz wird die Lumineszenz durch hohe exogene Reaktionen chemisch erzeugt. Für

Tab. 4: Alternative Markierungen (Fluoreszenz)

Vorteile	Nachteile
a) Keine Strahlungsgefahr	a) Eigenfluoreszenz der zu messenden Lösung (bei konventioneller Fluoreszenz)
b) Niedrige Nachweisgrenze (mit TRFIA)	b) Microtiterplattenassays nur möglich mit TRFIA
c) Markierungsmoleküle klein	c) Unempfindliche Assays mit konventioneller Fluoreszenz oder FPIA
d) Wiederholte Messungen der Proben möglich	

Tab. 5: Alternative Markierungen (Lumineszenz)

Vorteile	Nachteile
a) Keine radioaktive Strahlung	a) „One-off reaction“ bei der Chemilumineszenz
b) Reaktion voll steuerbar (Chemilumineszenz)	b) Reagenzien instabil (Biolumineszenz)
c) Niedrige Nachweisgrenze	c) Lichtabschwächungseffekt (Quenching)
d) Reagenzien stabil (Chemilumineszenz)	

die Lumineszenzimmunoassays gibt es zwei Prinzipien, a) die direkte Anwendung von Luminogenen wie die Diacetylhydrazide (Abkömmlinge des Luminols) (10) oder Acridiniumester (Abkömmlinge Lucigenin/Acridin) (9), die z. B. von Byk Sangtec oder CIBA-Corning benutzt werden

b) die lumineszenzverstärkten Enzymimmunoassays, die von Amersham International in ihrem Amerlite-System vertrieben werden (s. oben).

Vorteile von Lumineszenzimmunoassays sind die Empfindlichkeit (= niedrige Nachweisgrenze) und kurze Meßzeit (< 5 sec/Probe). Nachteil der „konventionellen Chemilumineszenz“ ist die einmalige Möglichkeit zu messen. Dies trifft bei den lumineszenzverstärkten Enzymreaktionen nicht zu.

Über diese Methoden kann sich der Leser in einigen Artikeln dieser Arbeitsgruppe informieren (10, 17, 18). Die Vor- und Nachteile der Lumineszenz sind in Tab. 5 dargestellt.

## Zusammenfassung und Ausblick

Laut den obengenannten Argumenten könnte der Verdacht entstehen, daß man den RIA endlich begraben sollte. Ist das wahr?

Obwohl es alternative Methoden gibt, die die Empfindlichkeit des RIA/IRMA erreichen, ja sogar übertreffen, gibt es keine einzige Methode, die eine so breite Palette wie das RIA/IRMA-System anzubieten hat.

Niemand wird ein teures Meßgerät (diese sind oft mit den „neueren“ Methoden unentbehrlich) für ein paar Parameter kaufen oder mieten.

Anders gesehen, muß der  $\gamma$ -Zähler durch drei oder vier Geräte ersetzt werden, um alles vom RIA auf EIA/FIA/LIA umzustellen.

Es gibt verschiedene Gebiete der Diagnostik, die von „RIA“ oder „Nicht-RIA“ beansprucht werden. Diese werden in Tab. 6 gezeigt.

Tab. 6: RIA/nicht-RIA („Gebietsansprüche“)

Radioimmunoassay	Alternative
a) Steroide	a) Medikamentenspiegel, Überwachung
b) Biogene Amine	b) AIDS-Diagnostik
c) Prostaglandine/ Thromboxane	c) Mikrobiologie/Virologie
d) Intestinale Peptide	

Tab. 7: Streptavidin-Biotin-Assays, Lactoferrin-Assay-Schema

10 µl Standard/Serum  
 200 µl Biotinylierter Antikörper in PBS-Tween  
 1 Anti-Lactoferrinbeschichtete Kugel (ILMA) oder -Microtiter-plattendelle (IFMA)

Inkubieren — 1 Std. Raumtemperatur  
 Waschen 2 x 5 ml Aqua demin (ILMA)  
 oder 5 x 200 µl 0,15 ml/l Tween 20 (IFMA)

200 µl Streptavidin-ABEN (ILMA)  
 oder Streptavidin-Eu (IFMA)

Inkubieren — 30 min Raumtemperatur  
 Waschen wie oben

Kugel überführen und im Luminometer messen — Meßzeit 2 sec (Lichtintegral) (ILMA)  
 oder 200 µl Verstärkungslösung in jede Delle pipettieren, 5 min warten und im ARCUS Fluorimeter messen (IFMA)

Die neuen Laborparameter, z. B. HIV-Suchtests, werden nur als nicht-radioisotopische Tests angeboten. Sie wurden von vorn herein mit den alternativen Markierungen entwickelt.

Andere Gebiete, z. B. die Steroide, bleiben dem RIA zunächst erhalten, weil die zu messenden Moleküle alle sehr klein und für einen Antikörper ähnlich aussehen. Deshalb sind minimale Änderungen derer Strukturen (z. B.  $^1\text{H}$  durch  $^3\text{H}$  oder  $^{12}\text{C}$  durch  $^{14}\text{C}$  zu ersetzen) erforderlich, um die Voraussetzung für hohe Spezifität von Antikörpern zu gewährleisten.

Es gibt einige Testbesteckhersteller, die immer noch nicht wissen, in welche Richtung sie ihre Entwicklung lenken sollen, um vom RIA wegzukommen.

Als Schlußidee wird ein „universelles Modellassay-System“ kurz mit Beispielen vorgestellt. Es wurde kürzlich ausführlich publiziert (17). Mit dem Einsatz des (Strept-)Avidin-Biotin-Systems kann man ein Assaysystem entwickeln, ohne sich auf einen Marker festzulegen. Im Gegenteil, man kann sich alle (oder fast alle) Kundenwünsche, die Markersubstanzen betreffen, damit erfüllen.

Das Assaysystem wird anhand der Lactoferrinbestimmung mittels ILMA und IFMA dargestellt.

Der ILMA (immunoluminometrischer Assay — analog dem IRMA) basiert auf Polystyrolkugeln und einer ABEN (7-N-[4-aminobutyl-N-ethyl]-2,3-dihydronaphthalazin-1,4-dion)-Markierung. Der IFMA (immunofluorometrischer Assay) wird in antikörperbeschichteten Mikrotiterplatten (oder Streifen) unter Verwendung von  $\text{Eu}^{3+}$  als Marker angesetzt.

Tab. 7 zeigt den Assayablauf, Abb. 1 eine Standardkurve beider Methoden. Präzisionsdaten sind anderswo für den ILMA veröffentlicht; die für den IFMA sind vergleichbar.

## LACTOFERRIN

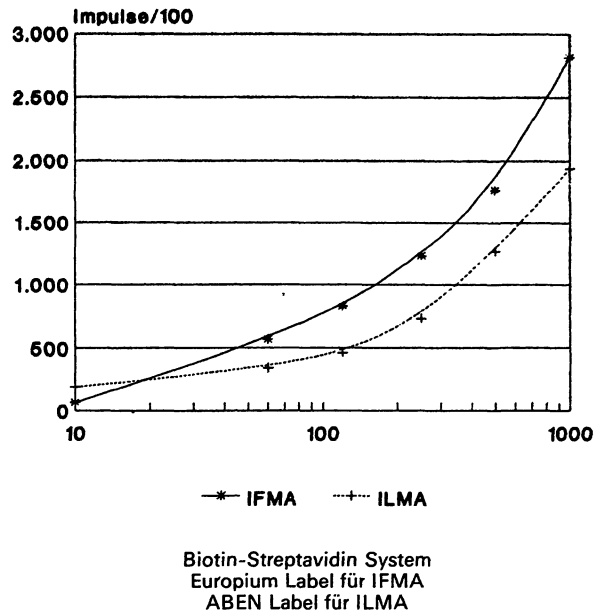


Abb. 1: Typische Eichkurvenverläufe für die in Tab. 7 dargestellten Lactoferrin immunometrischen Assays

Man sieht, daß alle Komponenten (Antikörper, Standard Assaypuffer) in diesem System gleich sind, nur die Markierung des Streptavidins entscheidet, welches Meßgerät bzw. Meßmethode angewandt wird. Die Waschlösungen sind unterschiedlich, obwohl die verdünnte Tween 20-Lösung für beide Methoden angesetzt werden kann.

Die Streptavidin-Markierungen können entweder lyophilisiert (wie beim Streptavidin-ABEN) in biotinfreiem foetalen Kälberserum bzw. 50 g/l Rinderserumalbumin oder in Glycerol-Tris-puffer (Streptavidin- $\text{Eu}^{3+}$ ) (40% Glycerol in 0,05 mol/l Tris-HCl mit 0,15 mol/l  $\text{NaN}_3$ , pH 7,6) aufbewahrt werden. Beide sind in dieser Form bei  $4^\circ\text{C}$  für längere Zeit (> 12 Monate) stabil. Für die Aufbewahrung von Streptavidin-alkalische Phosphatase werden 0,1 mmol/l  $\text{MgCl}_2$  und 0,01 mmol/l  $\text{ZnCl}_2$  zugesetzt.

Aus diesem kurzen Ausflug in die Welt der Immunoassays sind sechs Schlüsse zu ziehen:

- Der RIA/IRMA hat noch einige Jahre, trotz verstärkten „Umweltbewußtseins“, vor sich.
- Mit Hilfe des (Strept-)Avidin-Biotin-Systems ist es möglich, Optionen offen zu halten, welche Markersubstanz man am Ende einsetzt.
- Es geht oft nicht um die Frage der Markierung, sondern um den Aufbau des Assaysystems (robuste Festphasen-Technik). Anders ausgedrückt, die Wahl des Signalträgers ist meistens zweitrangig.
- Alternative Markierungsmethoden sind vorhanden, die zum Teil vom Einsatzgebiet abhängen.
- Der Einsatz modernster Elektronik erlaubt es, die neuen Methoden mit vergleichbarer Präzision dem RIA gleichzustellen. Ein hohes Maß an Automatisierung wird auch möglich sein.

f) Es gibt keine „Einzelalternative“ zum RIA. Es werden sich mehrere Systeme/Markierungen (z.T. patentbedingt) durchsetzen.

### Danksagung

Der Autor bedankt sich bei Frau Betina Polke für das Schreiben dieses Manuskriptes.

### Schrifttum:

1. YALOW, R. S., BERSON, S. A.: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184, 1648–1649 (1959).
2. VAN WEEMAN, B. K., SCHUURS, A. H. W. M.: Immunoassay using antibody labelled enzyme conjugates. *FEBS Lett.* 15, 232–236 (1971).
3. ARAKAWA, H., MAEDA, M., TSUJI, A.: Enzyme immunoassay of cortisol by chemiluminescence reaction of luminol-peroxidase. *Bunseki Kagaku* 26, 822–827 (1976).
4. ISHIKAWA, E.: Enzyme immunoassay of insulin by fluorimetry of the insulin-glucosylase complex. *J. Biochem.* 73, 1319–1321 (1973).
5. ENGVALL, E., PERLMANN, P.: Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871–874 (1971).
6. CATT, K., TREGGAR, G. W.: Solid phase radio immunoassay in antibody coated tubes. *Science* 158, 1570 (1967).
7. BECK, P., HALES, C. N.: Immunoassay of Serum polypeptide hormones by using  $^{125}\text{I}$ -labelled anti-(immunoglobulin-G) antibodies. *Biochem. J.* 145, 607–616 (1975).
8. WATSON, R. A. A., LANDON, J., SHAW, E. J., SMITH, D. S.: Polarisation fluorimetry assay of gentamicin. *Clin. Clin. Acta* 73, 51–55 (1976).
9. WEEKS, I., BEHESHTI, I., Mc CAPRA, F., CAMPBELL, A. K., WOODHEAD, J. S.: Acridinium esters as high-specific-activity labels in immunoassays. *Clin. Chem.* 29, 1474–1479 (1983).
10. WOOD, W. G.: Luminescence immunoassays. The state of the art. In: *Immunoassay Technology*, Vol. 1. (PAL, S. B., ed.), de Gruyter, Berlin, New York, pp. 105–150 (1985).
11. ROSENTHAL, A. F., VARGAS, M. G., KLASS, C. S.: Evaluation of enzyme-multiplied immunoassay technique (EMIT) for determination of serum digoxin. *Clin. Chem.* 22, 1899–1902 (1976).

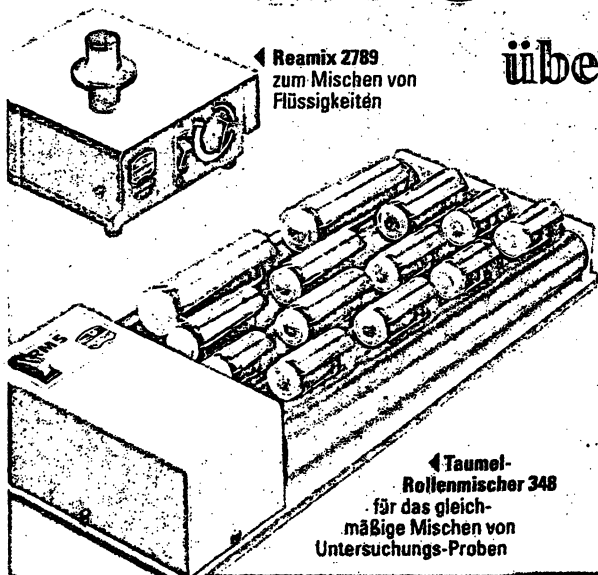
12. SOKOLOWSKI, G., WOOD, W. G.: In: *Radioimmunoassay in Theorie und Praxis* – ein Handbuch für Anfänger und Fortgeschrittene. Schnetzler Verlag, Konstanz, S. 31 (1981).
13. JOSHI, U., RAGHAVAN, V., ZEMSE, G., SHETH, A., BORKAR, P. S., RAMA-CHANDRAN, S.: Use of "Penicillinase" in the estimation of human chorio gonadotropin and human placental lactogen by enzyme linked immunoassays. In: *Enzyme labelled Immunoassay of Hormones and Drugs* (PAL, S. B., ed.), de Gruyter, Berlin, New York, pp. 233–245 (1978).
14. VAVILOV, S. I., SEVCHENKO, A. N.: *Comptes rendus acad. sci. URSS* 27, 541 (1940) – Zitiert von Weissman, S. I. – Intramolecular Energy Transfer – The fluorescence of complexes of europium. *J. Chem. Phys.* 10, 214–217 (1942).
15. SOINI, E., KOJOLA, H.: Time resolved fluorometry with lanthanide chelates – a new generation of non-isotopic immunoassay. *Clin. Chem.* 29, 65–68 (1983).
16. DIAMANDIS, E. P., MARTIN, C. P.: Time resolved fluorescence using a europium chelate of 4,7-bis-(chlorosulfonyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid (BCPDA). *Immunol. Meth.* 112, 43–52 (1988).
17. WOOD, W. G.: A universal solid-phase assay system based on Avidin-Biotin Reagents. *Ärztl. Lab.* 35, 29–34 (1989).
18. BOGER, C., YUAN, H. Z., SCHULTEK, T., TEGTMEIER, K. F., WOOD, W. G.: Development and clinical evaluation of immunoluminometric assays for lactoferrin and elastase-Alpha1-proteinase inhibitor complexes in body fluids with special reference to bronchoalveolar lavage and neonatal sepsis. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 26, 645–651 (1988).

### Adresse des Verfassers:

Prof. Dr. hab. W. G. Wood, Ph.D. (Leeds)  
Klinische Laboratorien  
Klinik für Innere Medizin  
Medizinische Universität zu Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
2400 Lübeck 1

# Angeln Sie sich den richtigen Assistenten...

über 6000\* stehen  
zur Wahl!



Reamix 2789  
zum Mischen von  
Flüssigkeiten

Taumel-  
Rollenmischer 348  
für das gleich-  
mäßige Mischen von  
Untersuchungs-Proben

Zum Beispiel verschiedenste Geräte zum Rühren und Mischen von Flüssigkeiten. Abgebildet: ASSISTENT-Reamix = Schüttelgerät für Reagenzgläser bis 30 mm Ø und kleine Kolben; stufenlos einstellbar. ASSISTENT-Taumel-Rollenmischer mit 5 synchron laufenden diagonal exzentrisch gelagerten PVC-Rollen.

\* Lassen Sie sich von Ihrem Fachhändler den 228seitigen ASSISTENT-Katalog zeigen: Er enthält mehr als 6000 Instrumente und Geräte für die tägliche Praxis, im Labor, auf Station – aus Glas, Synthetik, Edelstahl – bis hin zur elektronisch gesteuerten »High-Tech«.

**Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG**  
D-8741 Sondheim/Rhön · Telefon (09779) 221 · Fax (09779) 1388 · Tx 672 865  
CH-8595 Altnau TG/Schweiz · Telefon (072) 65 22 22 · Fax (072) 65 22 27 · Tx 882 200  
F-91430 IGNY/Paris Z.I.5, Rue Lavoisier · Tél. (1) 69 85 37 37 · Fax (1) 60 19 07 15 · Tx 601 308  
A-6122 Fritzens/Tirol, Fischerweg 1 · Tel. (05224) 26 46 0 · Fax (05224) 26 46 75 · Tx 534 144