

## Stanovení koncentrace celkové bílkoviny v moči s pozitivní Bence Jonesovou bílkovinou

Tichý M.<sup>1,6</sup>, Maisnar V.<sup>2,6</sup>, Stulík J.<sup>3</sup>, Vávrová J.<sup>1</sup>, Friedecký B.<sup>1</sup>, Palička V.<sup>1</sup>, Špirková J.<sup>1</sup>, Žaloudková L.<sup>1</sup>, Hernychová L.<sup>3</sup>, Spáčilová J.<sup>1</sup>, Buchler T.<sup>4,6</sup>, Hájek R.

<sup>1</sup>Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové

<sup>2</sup>2. Interní klinika – Oddělení klinické hematologie LF UK a FN Hradec Králové

<sup>3</sup>Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové, Univerzita obrany Brno

<sup>4</sup>Onkologická klinika, Thomayerova nemocnice, Praha

<sup>5</sup>Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN Brno

<sup>6</sup>Česká myelomová skupina

### SOUHRN

**Cíl:** V rámci externí kontroly kvality SEKK, Gamapatie GP2/08 obdrželo 64 českých klinických laboratoří a 15 slovenských laboratoří vzorek moči od nemocné mnohočetným myelomem s Bence Jonesovou bílkovinou typu lambda.

**Metody:** Laboratoře provedly typizaci paraproteinu v moči imunofixací a stanovení celkové koncentrace bílkoviny v moči různými metodami, především turbidimetrií, metodou s pyrogallovou červení a s biuretovým činidlem.

**Výsledky:** Získané výsledky byly významně rozdílné. Metodou vysokorozlišovací dvourozměrné elektroforézy s následným westernblottingem byly ve zkoumané moči prokázány především fragmenty lehkých řetězců lambda o molekulové hmotnosti 12 000 Da.

**Závěr:** Stanovení koncentrace celkové bílkoviny v moči je z různých důvodů poměrně obtížné. Tato skutečnost je ještě zvýrazněna při přítomnosti fragmentů Bence Jonesovy bílkoviny v moči, jak prokázala i tato práce.

**Klíčová slova:** Bence Jonesova bílkovina, koncentrace bílkoviny v moči, fragmenty lehkých řetězců imunoglobulinů.

### SUMMARY

**Tichý M., Maisnar V., Stulík J., Vávrová J., Friedecký B., Palička V., Špirková J., Žaloudková L., Hernychová L., Spáčilová J., Buchler T., Hájek R.: Determination of total protein concentration in urine with positive Bence Jones protein**

**Background:** The optimal method for the measurement of urinary monoclonal free light chain (FLC) concentration has not been established. We have carried out an external quality control assessment with the participation of 79 clinical biochemistry laboratories from the Czech Republic and Slovakia.

**Methods:** The laboratories received a reference urine sample obtained from a patient with multiple myeloma and lambda FLC proteinuria and were asked to type the paraprotein using immunofixation and to measure total urinary protein using their established method, most commonly turbidimetry, pyrogallol red assay, and biuret assay.

**Results:** There was a very wide inter-laboratory variability in the protein concentration readouts with up to three-fold difference in some cases. High-resolution two-dimensional electrophoresis showed that a high proportion of the urinary paraprotein was composed of lambda light chain fragments with molecular weight of 12 kDa.

**Conclusions:** Our results highlight the challenges of reliable and reproducible measurement of urinary protein concentration in the presence of urinary FLCs.

**Key words:** Bence Jones protein, proteinuria, immunoglobulins, free light chains, monoclonal gammopathies.

## Úvod

Významným objevem v lékařství 19. století byl průkaz tzv. Bence Jonesovy bílkoviny (BJB) v moči nemocného mnohočetným myelomem. Až v roce 1962 Edelman a Solomon prokázali, že tato bílkovina s neobvyklými precipitačními vlastnostmi je tvořena volnými monoklonálními lehkými řetězci imunoglobulinů. Stanovení koncentrace bílkoviny v moči (proteinurie) je obtížné a žádná ze současných metod nespĺňuje plně analytická a medicínská kritéria. Tyto obtíže jsou ještě zvýrazněny při přítomnosti monoklonálních lehkých řetězců v moči. K ověření schopnosti laboratoří kvantifikovat proteinurii s převažujícím nálezem volných monoklonálních lehkých řetězců imunoglobulinů jsme využili externího kontrolního cyklu SEKK Gamapatie GP2/08, kterého se účastní některé české a slovenské klinické laboratoře. Výsledky uvádíme a komentujeme v tomto sdělení.

## Metody

Při kontrolním cyklu Gamapatie GP2/08, SEKK vyšetřilo vzorek B (kterým byla moč) 64 českých a 15 slovenských laboratoří, tj. dohromady 79 laboratoří. Laboratoře provedly typizaci paraproteinu v moči imunofixací. Dále stanovily celkovou bílkovinu v moči (vzorek B) těmito metodami: s pyrogallovou červení (set fy Pliva Lachema 4 laboratoře, Olympus 7 laboratoří, Beckman 4 laboratoře; set fy BLW 3 laboratoře, Randox 3 laboratoře a po 1 laboratoři od sety fy Thermo, BioVendor, Roche, Siemens-DADE a Human). Dohromady použilo metodu s pyrogallovou červení sety různé proveniencie 26 laboratoří. Metodu s biuretovým činidlem použilo 9 laboratoří (5 setem od fy Olympus, 2 setem od fy Roche a 2 setem od fy Abbott). Nejvíce laboratoří stanovilo koncentraci bílkoviny v moči turbidimetricky (22 laboratoří setem fy Roche, 9 setem fy Skalab, 3 setem od fy Abbott a

po jedné laboratoři sety fy Siemens – Bayer a DOT Diagnostics). Osm laboratoří použilo jiné metody – jiná barviva než pyrogallovou červeň nebo biuret, nefelometrii apod.

Kontrolní vzorek moče byl získán od 77leté nemocné mnohočetným myelomem s paraproteinem tvořeným volnými lehkými řetězce lambda, která byla léčena kombinací MPT – metotrexát, prednison, thalidomid. Vzorek moči byl konzervován přidáním azidu sodného (2 mg/l). Pro bližší charakterizaci bílkovin obsažených v kontrolním vzorku moče byla použita metoda vysokorozlišovací dvourozměrné elektroforézy s následným westernblottingem [3] se specifickou protilátkou proti lehkým řetězcům lambda (Sebia, Francie). Volné lehké řetězce lambda ve vzorku moči byly také stanoveny soupravami „FREELITE“, výrobce The Binding Site Ltd., Velká Británie.

## Výsledky

Výsledky stanovení koncentrace volných lehkých řetězců lambda v moči různými metodami v rámci systému externí kontroly kvality SEKK GP2/08 uvádíme v tabulce 1. Z dat plyne naprostá nesrovnatelnost výsledků dosažených jednotlivými metodami. Přitom při stanovení bílkoviny v moči kteroukoliv z nejčastěji používaných metod (biuret, pyrogallová červeň, turbidimetrie) jsou tyto metody při proteinurii bez přítomnosti BJB dobře klinicky využitelné. O tom svědčí externí kontrola kvality SEKK AM1/08 U-TP s těmito výsledky: biuret,  $n = 26$ ,  $CV\% = 6,4$ , pyrogallová červeň,  $n = 119$ ,  $CV\% = 5,8$  a turbidimetrie,  $n = 70$ ,  $CV\% = 8$ , ( $n =$  počet zúčastněných laboratoří).

**Table 1.** Results of protein concentration measurement in a reference sample from a patient with lambda free light chains in urine (SEKK, Gamapatie GP/08, System of External Quality Control in the Czech Republic)

Method	Number of laboratories	Total protein in urine $\pm$ SD [g/l]
Biuret assay	9	5.97 $\pm$ 3.23
Pyrogallol red assay	all kits	6.21 $\pm$ 0.98
	Olympus kits	7.02 $\pm$ 0.57
Other chromogenic methods	2	3.26 $\pm$ 0.48
Turbidimetry (BTC)	36	2.23 $\pm$ 0.54
Other methods	6	3.98 $\pm$ 1.91
FREELITE assay	1	8.53

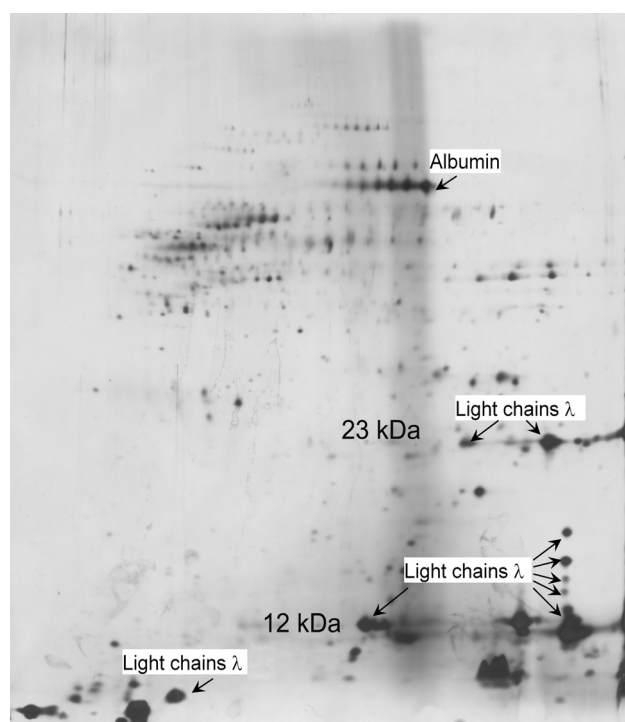
Výsledek vysokorozlišovací dvojrozměrné elektroforézy s následným blottingem je zobrazen na obrázku 1.

## Diskuse

Monoklonální volné lehké řetězce imunoglobulinů (tzv. Bence Jonesova bílkovina) bývají prokazovány v moči nemocných mnohočetným myelomem, Waldenströmovou makroglobulinémií, při AL amyloidóze

a u „light chains deposition disease“. Mohou být také prokázány v moči nemocných s lymfomy a chronickou lymfatickou leukémií. Jejich přítomnost v moči nemocných s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS) je nepříznivým prognostickým ukazatelem.

Velmi variabilní je molekulová hmotnost Bence Jonesovy bílkoviny [9, 10, 12]. V moči se vyskytuje ve formě monomerů (22 000 Da), dimerů (44 000 Da), nebo fragmentů o nízké molekulové hmotnosti (5 000–18 000 Da). Bence Jonesova bílkovina může také prokazovat vysoký stupeň polymerace. V moči se vyskytuje v koncentraci od několika mg/l až po desítky g/l [11]. Všechny tyto skutečnosti ovlivňují stanovení BJB v moči. Klasický termoprecipitační test je nespolehlivý, málo citlivý a má jen historickou cenu. Indikátorové papírky na průkaz bílkoviny v moči využívají tzv. proteinové chyby některých pH indikátorů (Protein-error reaction). Tyto indikátory (nejčastěji tetrabromfenolová modř) se v kyselé oblasti pH barví bez přítomnosti bílkoviny žlutě a v přítomnosti bílkoviny (albuminu) reagují jako v alkalickém prostředí se zabarvením do zelenomodra. Diagnostické proužky jsou však většinou málo citlivé na BJB a nemusí její přítomnost v moči vůbec zaznamenat [10]. Pro průkaz monoklonálních volných lehkých řetězců imunoglobulinů a jejich typizaci je preferováno vyšetření moče imunofixační elektroforézou (zahuštěné, popř. naředěné). Nejčastější metoda pro kvantifikaci bílkoviny v moči je turbidimetrie s benzetonium chloridem. Další frekventovanou metodou je využití vazby různých barviv na bílkoviny, jako např. pyrogallová červeň, coomassie modř apod. V menší míře je využívána pro kvantifikaci proteinurie reakce s biuretovým činidlem. Všechny tyto metody jsou málo citlivé na mi-



**Fig. 1.** Silver-stained two-dimensional gel electrophoresis of urine with lambda free light chains (pH = 4–7)

kroproteiny obecně, a zvláště na monoklonální lehké řetězce imunoglobulinů [10]. Na velkou variabilitu hodnot celkové bílkoviny v moči v přítomnosti BJB ukazují i naše výsledky prezentované v této práci. Ke studii jsme využili výsledky externí kontroly kvality SEKK, Gamapatie. Laboratořím byla jako kontrolní vzorek „B“ rozeslána moč od nemocné mnočetným myelomem IgG-lambda. Moč obsahovala vysokou koncentraci volných monoklonálních lehkých řetězců lambda. Jak je uvedeno v tabulce 1, laboratoře došly podle použité metody k značně rozdílným výsledkům při stanovení koncentrace bílkoviny v moči. Metody s pyrogallovou červení dávaly asi trojnásobně vyšší hodnoty než metody turbidimetrické. Stanovili jsme také koncentraci volných lehkých řetězců lambda v tomto vzorku moči soupravami FREELITE, The Binding Site Ltd., Birmingham, Velká Británie. Jsme si vědomi, že stanovení volných lehkých řetězců (FLC) v moči těmito soupravami není zatím doporučováno. Získali jsme hodnotu 8,531 g/l. Získané hodnotě se nejvíce blíží koncentrace bílkoviny v moči stanovená soupravami Urinary/CSF Protein fy Olympus. Tuto metodu použilo 7 laboratoří s průměrným výsledkem 7,02 g/l ± 0,57g/l. Při opakování stanovení touto metodou s pečlivým ředěním jsme obdrželi hodnotu 8,30 g/l.

Rozdílné výsledky jsou zapříčiněny řadou faktorů, z nichž asi známe jen některé. Především variabilita molekulové hmotnosti BJB je velká [4, 14]. V moči můžeme nalézt monomery, dimery BJB, fragmenty, nebo může docházet k polymeraci. Dvojrozměrnou vysokorozlišovací elektroforézou (viz obr. 1) jsme našli v analyzovaném vzorku moči jak monomery BJB lambda, tak fragmenty o 12 000 Da (v nálezů vysoce převažovaly), a dále fragmenty o ještě nižší molekulové hmotnosti (6000–8000 Da). Fragmenty FLC jsou z klinického hlediska významné, protože jsou ve zvýšené míře amyloidogenní [4, 14].

Problematické je zatím stanovení koncentrace monoklonálních FLC v moči [1, 7, 13]. I když někteří autoři navrhuje stanovení poměru lehkých řetězců v moči, popř. v séru [11] jako alternativní nebo doplňkovou metodu pro detekci BJB [5, 6, 8], koncentrace FLC v séru a v moči spolu nemusí korelovat, závisí na funkci ledvin a nemusí být v poměru k aktivitě a mase nádorové hmoty [11]. Také extrémní rozpětí koncentrací FLC v moči od mg až po několik gramů [11] a chybějící standardizace metod ke stanovení FLC [2] zůstávají otevřeným problémem. Beethem et al. [13] se domnívají, že zatím stanovení BJB v moči nelze opominout ve screeningovém algoritmu při diagnostice monoklonálních gamapatií. Guidelines College of American Pathologists proto doporučují tuto následující proceduru pro vyšetření moče u monoklonálních gamapatií: stanovení celkové bílkoviny ve vzorku moče sbírané 24 hod., provedení elektroforézy a imunofixace v koncentrované moči, denzitometrický scan píku po elektroforetickém rozdělení bílkovin moče a výpočet koncentrace BJB z poměru v procentech k celkové bílkovině stanovené v moči

[10]. Tato procedura má řadu nedostatků, zejména požadované vyšetření celkové bílkoviny v moči, jak ukazuje i tato práce. Doporučuje se proto sledovat koncentraci BJB v moči u téhož nemocného vždy stejnou metodou.

Na základě literárních i našich výše uvedených poznatků nezbývá než zatím konstatovat, že stanovení celkové bílkoviny v moči poskytuje za přítomnosti BJB velmi kontroverzní výsledky.

## Literatura

1. **Snyder, M. R., Clark, R., Bryant, S. C., Katzman, J. A.** Quantification of urinary light chains. *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 1744–1746.
2. **Nakano, T., Miyazaki, S., Takahashi, H., Matsumori, A., Maruyama, T., Komoda, T., Nagata, A.** Immunochemical quantification of free immunoglobulin light chains from an analytical perspective. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006, 44, p. 522–532.
3. **Tichý, M., Stulík, J., Kovářová, H., Matěja, F., Urban, P.** Analysis of monoclonal immunoglobulin light chains in urine using two-dimensional electrophoresis. *Neoplasma*, 1995, 42, p. 31–34.
4. **Marshall, T., Williams, K. M.** Clinical analysis of human urinary proteins using high resolution electrophoretic methods. *Electrophoresis*, 1998, 19, p. 1752–1770.
5. **Abraham, R. S., Clark, J. C., Bryant, S. C., Lymp, J. F., Larson, T., Kyle, R. A., Katzmann, J. A.** Correlation of serum immunoglobulin free light chain quantification with urinary Bence Jones protein in light chain myeloma. *Clin. Chem.*, 2002, 48, p. 655–657.
6. **Hill, P. G., Forsyth, J. M., Rai, B., Mayne, S.** Serum free light chains: an alternative to the urine Bence Jones proteins screening test for monoclonal gammopathies. *Clin. Chem.*, 2006, 52, p. 1743–1748.
7. **Singhal, S., Stein, R., Vickrey, E., Mehta, J.** The serum-free light assay cannot replace 24-hour urine protein estimation in patients with plasma cell dyscrasias. *Blood*, 2007, 109, p. 3611–3612.
8. **Nakano, T., Nagata, A., Takahashi, H.** Ratio of urinary free immunoglobulin light chain to in the diagnosis of Bence Jones proteinuria. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2004, 42, p. 429–434.
9. **Kaplan, B., Ramirez-Alvarado, M., Dispenzieri, A., Zeldenrust, S. R., Leung, N., Livneh, A., Gallo, G.** Isolation and biochemical characterization of plasma monoclonal free light chains in amyloidosis and multiple myeloma: a pilot study of intact and truncated forms of light chains and their charge properties. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2008, 46, p. 335–341.
10. **Graziani, M., Merlini, G., Petrini, C. for the IFCC Committee on plasma proteins and the SIBioC study group on proteins.** Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003, 41, p. 338–346.
11. **Nowrousian, M. R., Brandhorst, D., Sammet, C., Kellert, M., Daniels, et al.** Serum free light chain analysis and urine immunofixation electrophoresis in patients with multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11, p. 8706–8714.
12. **Diemert, M. C., Musset, L., Gaillard, O., Escolano, S., Baumelou, A., Rousselet, F., Galli, J.** Electrophoretic study of the physico-chemical characteristics of Bence-Jones proteinuria and its association with kidney damage. *J. Clin. Pathol.*, 1994, 47, p. 1090–1097.
13. **Beetham, R., Wassell, J., Wallage, M. J., Whiteway, A. J., James, J. A.** Can serum free light chains replace urine

electrophoresis in the detection of monoclonal gammopathies? *Ann. Clin. Biochem.*, 2007, 44, p. 516–522.

14. **Buxbaum, J.** Mechanisms of disease: monoclonal immunoglobulin deposition. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 1992, 6, p. 323–346.

Tato studie byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906 (MZČR) a IGA MZČR NS 10387-3/2009.

Do redakce došlo 10. 9. 2009.

Adresa pro korespondenci  
Prof. RNDr. Miloš Tichý, CSc.  
ÚKBD LF UK a FN  
Sokolská 581  
500 05 Hradec Králové  
e-mail: tichy@fnhk.cz

---

## Zaujalo nás

---

### Diskuse o glukometrech pokračuje

Časopis *Clinical Chemistry* je obohacen o nové stránky s názvem Q and A (Questions and Answers). Jde o moderovanou, písemně dokumentovanou diskusi několika expertů o některé aktuální otázce laboratorní medicíny. V červnovém čísle byla zajímavá diskuse o možnostech aplikace hmotnostní spektrometrie v endokrinologii a toxikologii, v srpnovém čísle je neméně zajímavá diskuse o neustávajících problémech měření glukózy v krvi glukometry.

V diskusi byl řešen problém, zdali intenzivní sledování glukózy (tight glucose control) u kriticky nemocných pacientů, zejména pak u pacientů léčených intravenózními infuzemi inzulínu, může být prováděno glukometry. Pokusím se ve zkratce o souhrn závěrů z diskuse, které by mohly zajímat laboratorní pracovníky nejvíc a na nichž se čtyři diskutující vcelku shodli.

- Jakou maximální chybu by mělo mít měření glukometry při selfmonitoringu pacientů s diabetem II typu? 95 % výsledků by mělo mít nižší chybu než 15 % vůči referenční metodě. Ve srovnání s platnou normou ISO 15197 je to přísnější požadavek. Ta požaduje, aby bylo 95 % výsledků s chybou < 20 % pro koncentrace > 4,2 mmol/l a < 0,86 mmol/l pro koncentrace < 4,2 mmol/l.
- Jakou maximální chybu by mělo mít měření glukometry při monitoringu pacientů v kritickém stavu s intravenózní infuzí inzulínu?

Diskutující se zde logicky shodli na přísnějších požadavcích. Chyba by měla být:

– < 10 % pro 5,6–11,1 mmol/l,

– < 15 % pro koncentrace vyšší než 11 mmol/l,  
– < 0,6 mmol/l pro koncentrace nižší než 5,6 mmol/l.

- Obecné požadavky na kvalitu glukometrů:

1. Sledování kriticky nemocných pacientů vyžaduje kvalitnější glukometry než selfmonitoring, diabetes I typu lepší než diabetes II typu.
2. Sledování glukózy v krvi u kriticky nemocných pacientů by bylo v zásadě možné, kdyby byly k dispozici dostatečně kvalitní glukometry a také kvalitní obsluha.
3. Obecně je glukometrů v dostatečné kvalitě stále nedostatek.
4. FDA zatím neschválila ani jeden glukometr k účelu sledování glukózy u kriticky nemocných pacientů.

- Jakých hodnot glukózy má být při léčbě dosaženo? Za současné situace není možné stanovit jednoznačně jednu cílovou hodnotu pro optimální terapii. Zcela nová britská studie pacientů na jednotkách intenzivní péče došla dokonce k závěru, že hodnoty kolem 8 mmol/l ukazují na lepší prognózu, než hodnoty kolem 6,6 mmol/l.

#### Závěr

Mám pocit, že v diskusi zaznělo příliš mnoho protimluvů a odpověď na položenou otázku nebyla řečena.

*Bedřich Friedecký*