

***INTERPRETACION DEL
PROTEINOGRAMA ELECTROFORETICO E
INMUNOFIJACION. UTILIDAD DEL TEST
DE CADENAS LIGERAS LIBRES.***

**IBETH NEYRA VERA
MEDICA PATOLOGA CLINICA
SERVICIO DE INMUNOLOGIA Y BIOQUIMICA- DPC
HNERM**

Introducción

- Las gammapatías monoclonales son un conjunto de trastornos asociados a proliferación de células B maduras.
- Caracterizadas en su mayoría, por la secreción de moléculas de inmunoglobulinas (intactas o fragmentos) homogéneas desde el punto de vista inmunoquímico y electroforético, habitualmente llamadas componente monoclonal.
- En la mayoría de los casos sin consecuencias clínicas importantes; producen manifestaciones clínicas debido a la proliferación celular clonal neoplásica o al efecto biológico de la proteína monoclonal sobre diferentes órganos o sistemas.

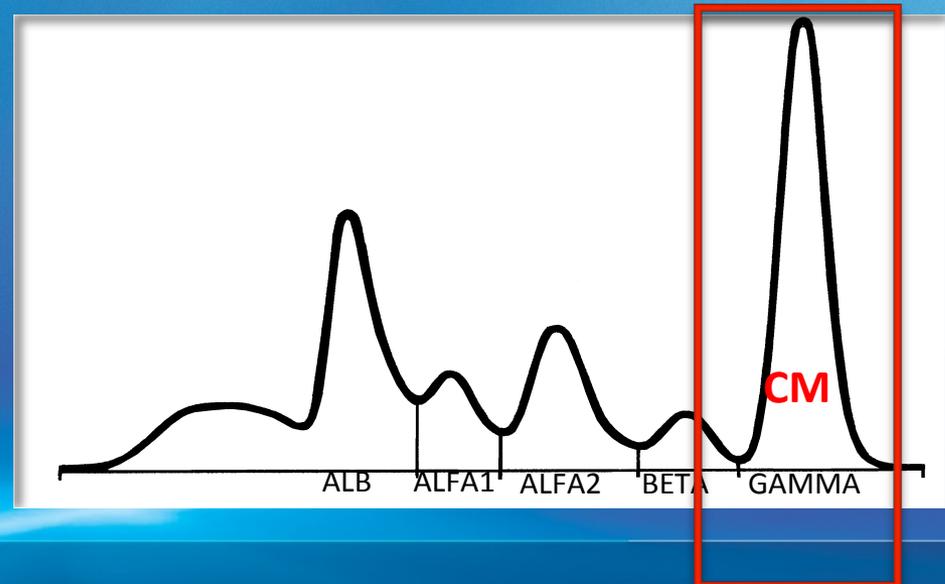
Condiciones clínicas asociadas a gammapatía monoclonal

Clinicamente manifiestas	Sin clinica
<p>Derivadas de enfermedades <u>malignas</u> de las células B</p> <ul style="list-style-type: none"> Mieloma Múltiple y sus variantes <ul style="list-style-type: none"> Mieloma sintomático Mieloma quiescente, latente o asintomático Mieloma no secretor Leucemia de células plasmáticas Mieloma Osteosclerótico (POEMS) Plasmocitoma <ul style="list-style-type: none"> Óseo Solitario Extramedular Otros procesos linfoproliferativos <ul style="list-style-type: none"> Macroglobulinemia de Waldenström Linfoma No Hodgkin Leucemia linfocítica crónica Enfermedad de cadenas pesadas (α, γ, μ) 	<p>Gammapatías monoclonales transitorias</p> <ul style="list-style-type: none"> Infecciones (víricas o bacterianas) Enfermedades autoinmunes Estados de inmunodeficiencia transitorios Reconstitución de la médula ósea después de un trasplante de progenitores hematopoyéticos
<p>Enfermedades relacionadas con la presencia de CM</p> <ul style="list-style-type: none"> Crioglobulinemia Amiloidosis AL Enfermedad por depósito de cadenas ligeras o pesadas Polineuropatías secundarias a CM Crioaglutininas 	<p>Gammapatías monoclonales de significado incierto (GMST)</p>

Rol del laboratorio en el estudio de las gammapatías monoclonales

- La concentración del componente monoclonal está relacionada con la masa del clon que la produce.
- Es un marcador bioquímico esencial.

- Diagnóstico
- Pronóstico
- Monitorización
- Tratamiento



Estudio laboratorial del componente monoclonal

Implica tres fases:

- Detección
- Identificación
- Cuantificación

Métodos analíticos empleados en el estudio de los componentes monoclonales

- Cuantificación de proteínas totales, inmunoglobulinas totales.
- Electroforesis de suero y orina
- Inmunofijación de suero y orina
- Cuantificación de cadenas ligeras libres (nefelometría o turbidimetría)
- Cálculo del cociente kappa/lambda

Requerimientos laboratoriales

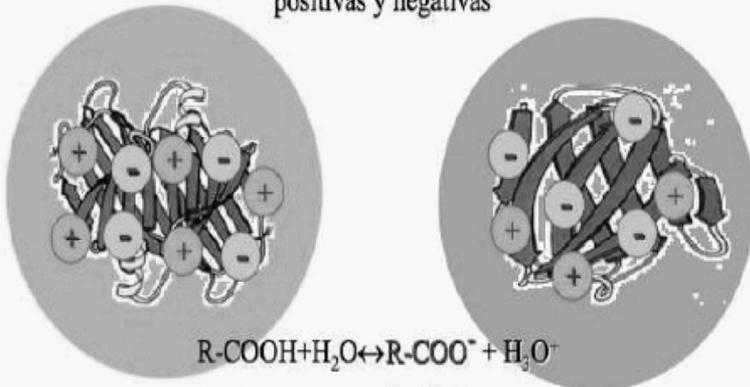
- Fase preanalítica:
 - Suero
 - Orina de 24 horas
- Fase analítica:
 - Especificaciones analíticas de calidad como son: CV, Variabilidad biológica, error sistemático y total.
- Fase post analítica:
 - Emisión del reporte final (gráficos, interpretación, cuantificación del CM de ser posible (suero y orina))

Detección y cuantificación

Electroforesis

- Técnica de **separación** consistente en el **transporte de iones a través** de una disolución por la acción **de un campo eléctrico**. Los iones presentes en la disolución se mueven hacia uno u otro electrodo según su propia carga.

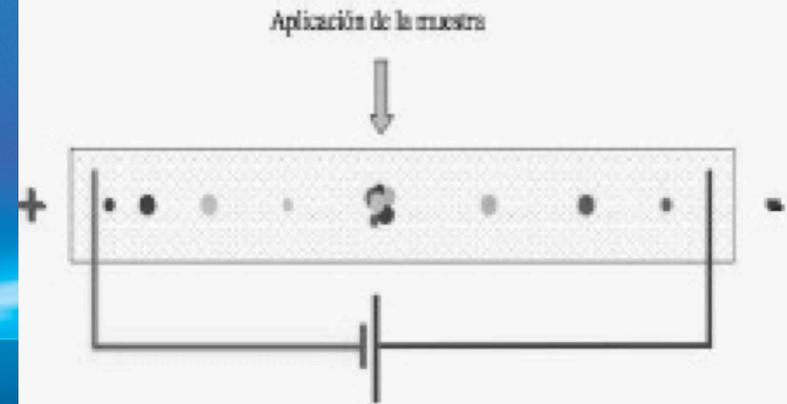
Los grupos funcionales ácidos y básicos presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos, al disociarse en el agua, confieren a la proteína cargas positivas y negativas



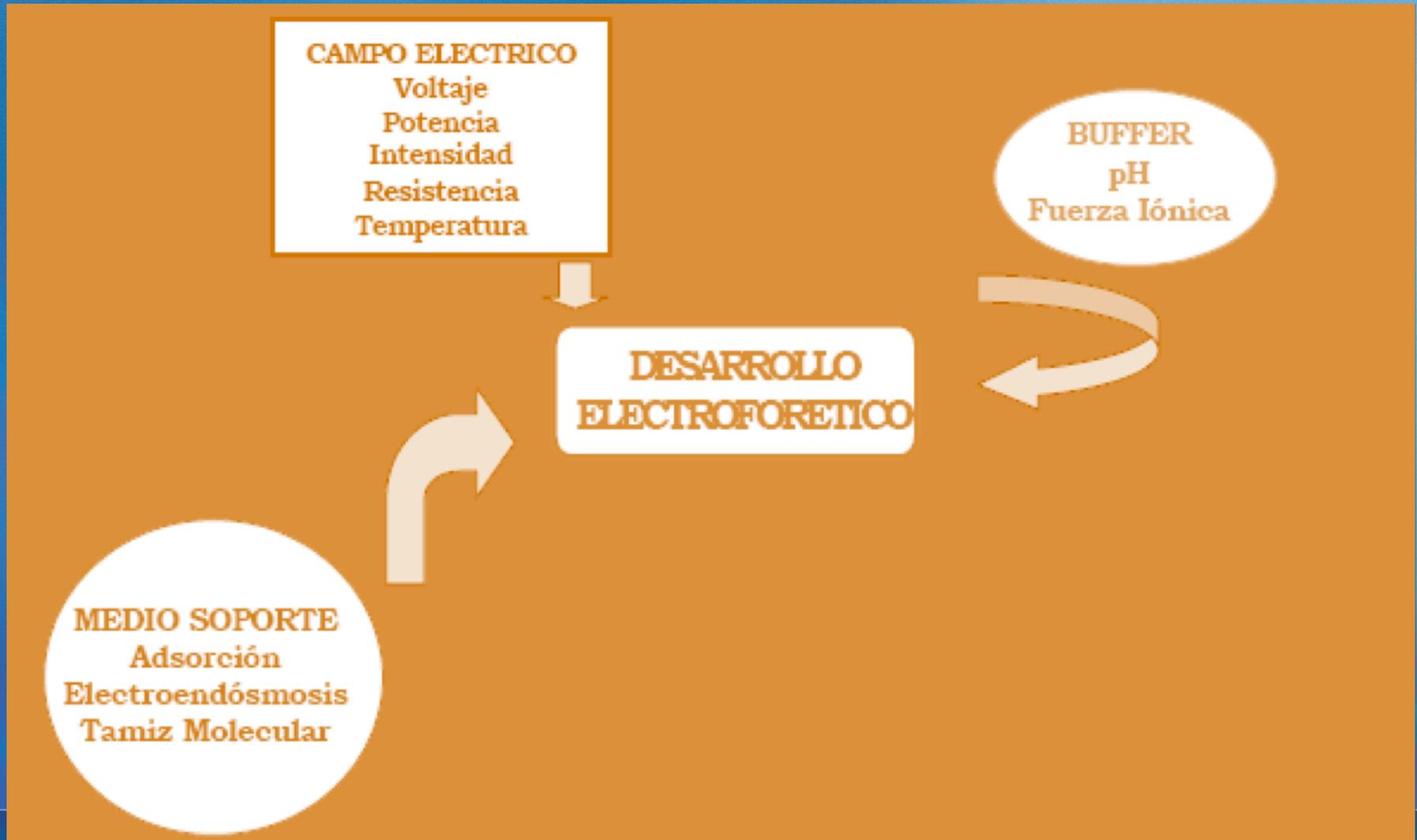
La carga neta de una proteína depende de la suma de cargas de ambos signos

Sametidas a un campo eléctrico, las proteínas son capaces de moverse en función de su carga y tamaño

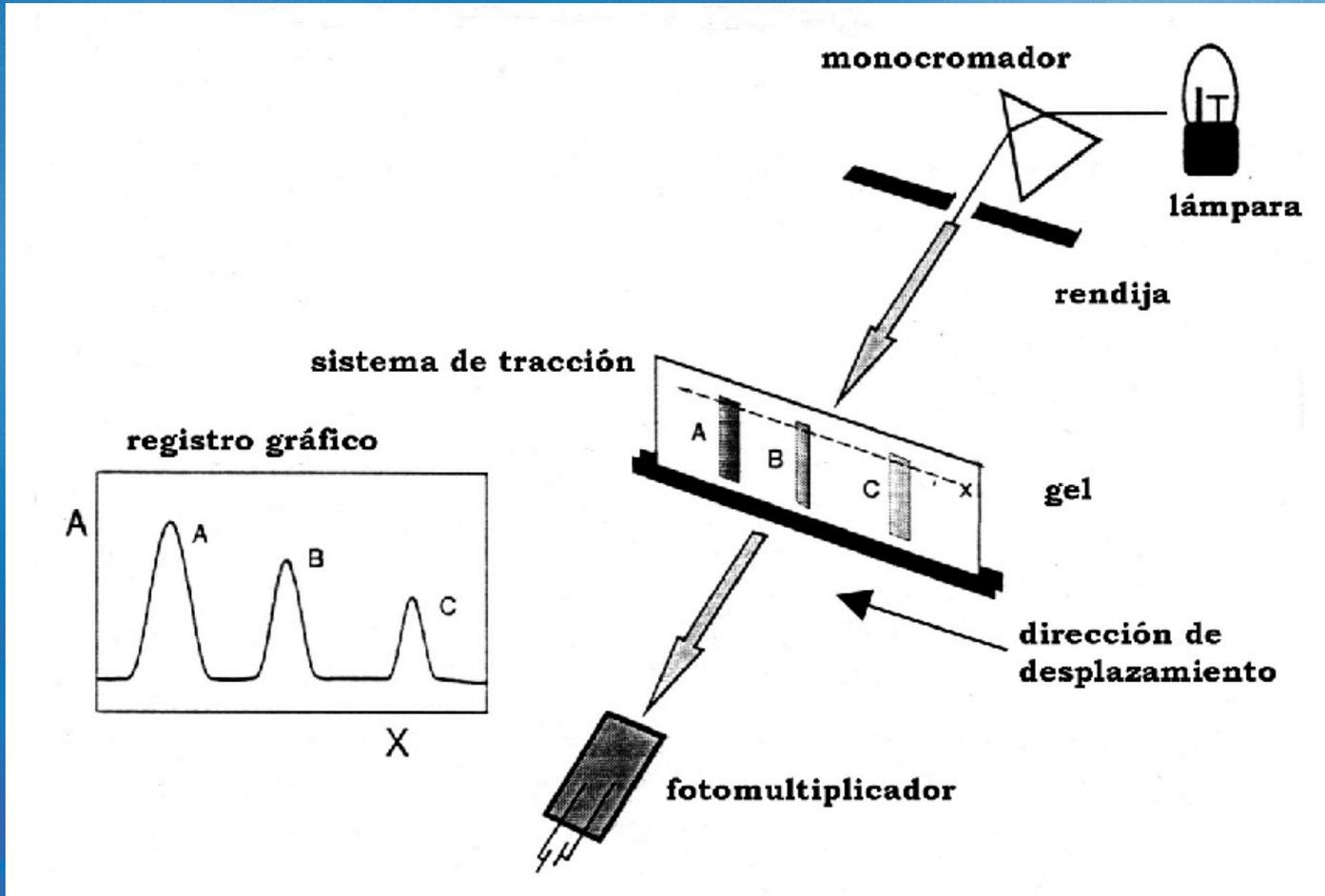
La movilidad electroforética es proporcional al cociente: Carga/Masa



Factores que afectan la electroforesis



DENSITOMETRO



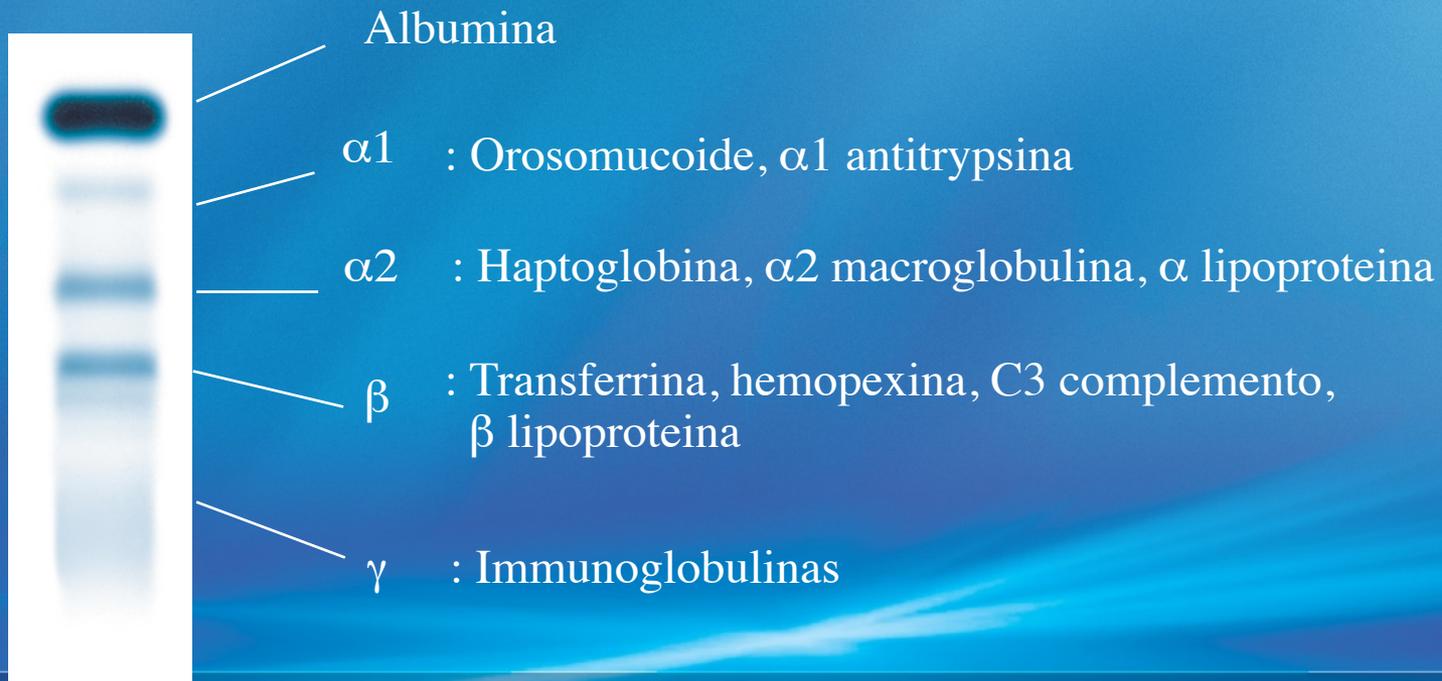
Sensibilidad analítica de la electroforesis **500-2000 mg/L**

Cuantificación proteica total

- Métodos colorimétricos
 - Biuret (2- 12 g/dl)
- Métodos turbidimétricos o nefelométricos (1.0 mg/dl)

ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS COMPONENTES DE UN ESPECIMEN CON ELECTROFORESIS DE ZONA

- **ANALISIS CUALITATIVO:** Identificar, visualizar, localizar
- **ANALISIS CUANTITATIVO:** Densitometría



Análisis electroforético de los componentes de un espécimen con electroforesis capilar



- Método automatizado
- Separa partículas cargadas que migran a distinta velocidad en un campo eléctrico, en un capilar de sílice fundido
- Detector de lectura UV (220 nm), lectura directamente proporcional a la cantidad de enlace peptídico de la muestra.

Electroforesis de zona versus electroforesis

EF en gel de agarosa

- Sensibilidad menor de 0,5-2,0g/L
- Cuantificación del CM por densitometría (colorante fijado)
- Semiautomatizada

EF capilar

- Sensibilidad 0,2g/L -0.5g/L
- Cuantificación del CM espectrofotometría en UV directamente proporcional a la cantidad de enlace peptídico
- Automatizado

Criteria que definen separación electroforética de alta calidad

- debe ser visible en suero normal la banda tenue de la prealbúmina
- debe reconocerse la heterozigosis de la alfa1-antitripsina
- debe diferenciarse alfa2-macroglobulina y haptoglobina en zona alfa2
- la zona beta debe estar dividida en dos bandas (β 1 transferrina y β 2 C3 nativo)
- debe detectarse CM <1g/L y oligoclonalidad en la zona gamma

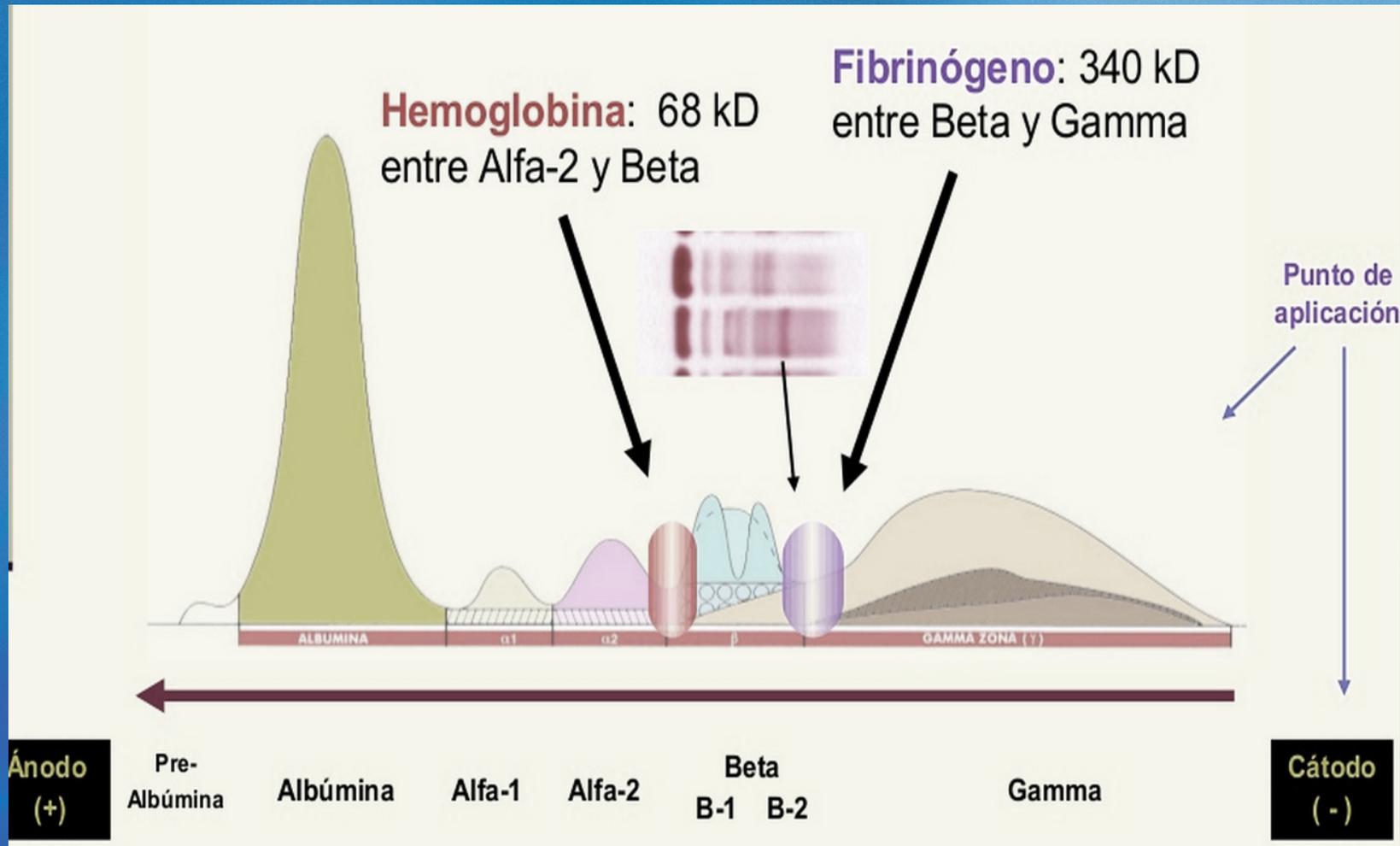
Ventajas de la medición de componente monoclonal

COEFICIENTE DE VARIACION TOTAL ANALITICO Y BIOLOGICO

	PICO MONOCLONAL SUERO >10g/L	PICO MONOCLONAL ORINA >=200MG/24Hr	CLL>100 mg/L	IgG suero
CV TOTAL	8.1	35.8	28.4	13
CV ANALITICO	2.1	4.5	5.8	4.2
CV BIOLOGICO	7.8	35.5	27.8	12.3



Limitaciones



Limitaciones

Falsos positivos:

- Fibrinógeno y sus productos de degradación.
- Proteína C reactiva.
- Hemólisis.
- Muestras contaminadas o sometidas a procesos de congelación descongelación.
- Administración endovenosa de contrastes yodados.

Utilizar siempre **muestras de suero reciente** o en su defecto **congelar** la muestra.

Son relativamente estables a 4 °C la Ig A e Ig G.
Ig M tiende a desnaturalizarse.
Ig D muy sensible a proteasas.
Ig E poco estable.

Falsos negativos:

- CM débiles
- CM débil superpuesto a una banda.
- Inmunoglobulinas polimerizadas (bandas de aspecto policlonal).
- Crioglobulinas.

Limitaciones de la electroforesis en gammapatías

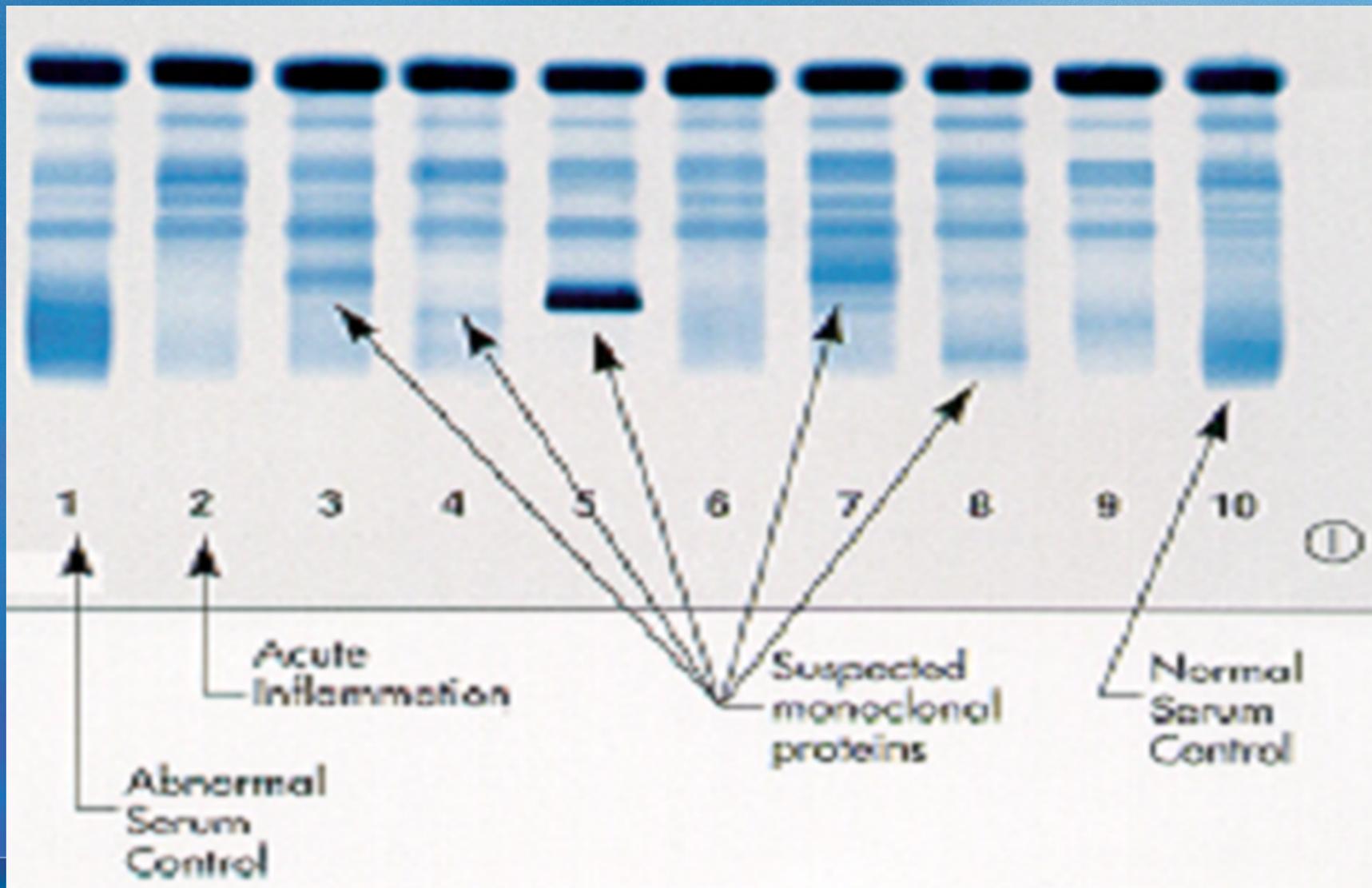
- Las bandas Ig A pueden ocultarse por la transferrina
- El metabolismo de la IgG es variable
- Cambios en el hematocrito y volumen plasmático afectan las mediciones

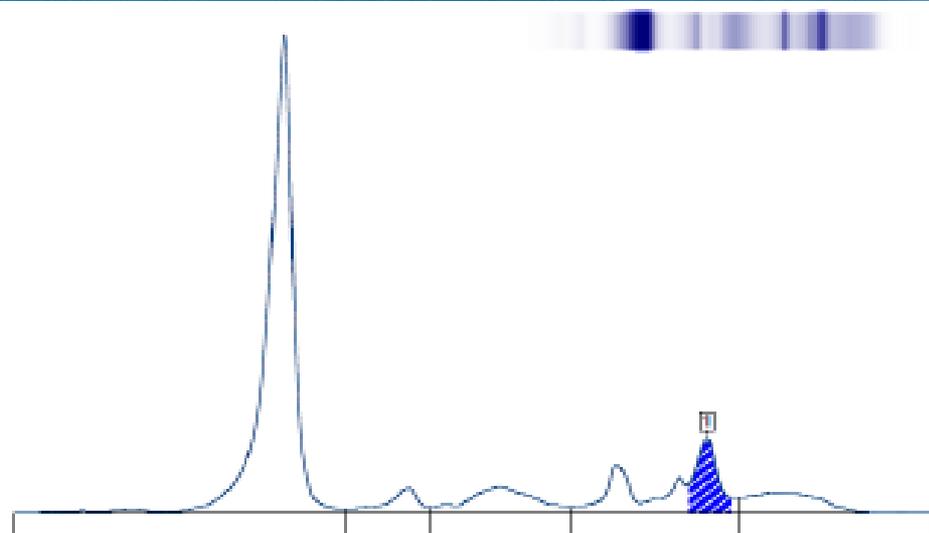


Bandas oligoclonales

- Predominantemente IgG Kappa.
- Pueden ser interpretados de modo erróneo como recaída
- Suelen ser debido a:
 - Respuesta inmune en individuo sano
 - Autoanticuerpos
 - Ac. a proteínas virales
 - Pacientes post transplantados (10-73%)

Algunos ejemplos



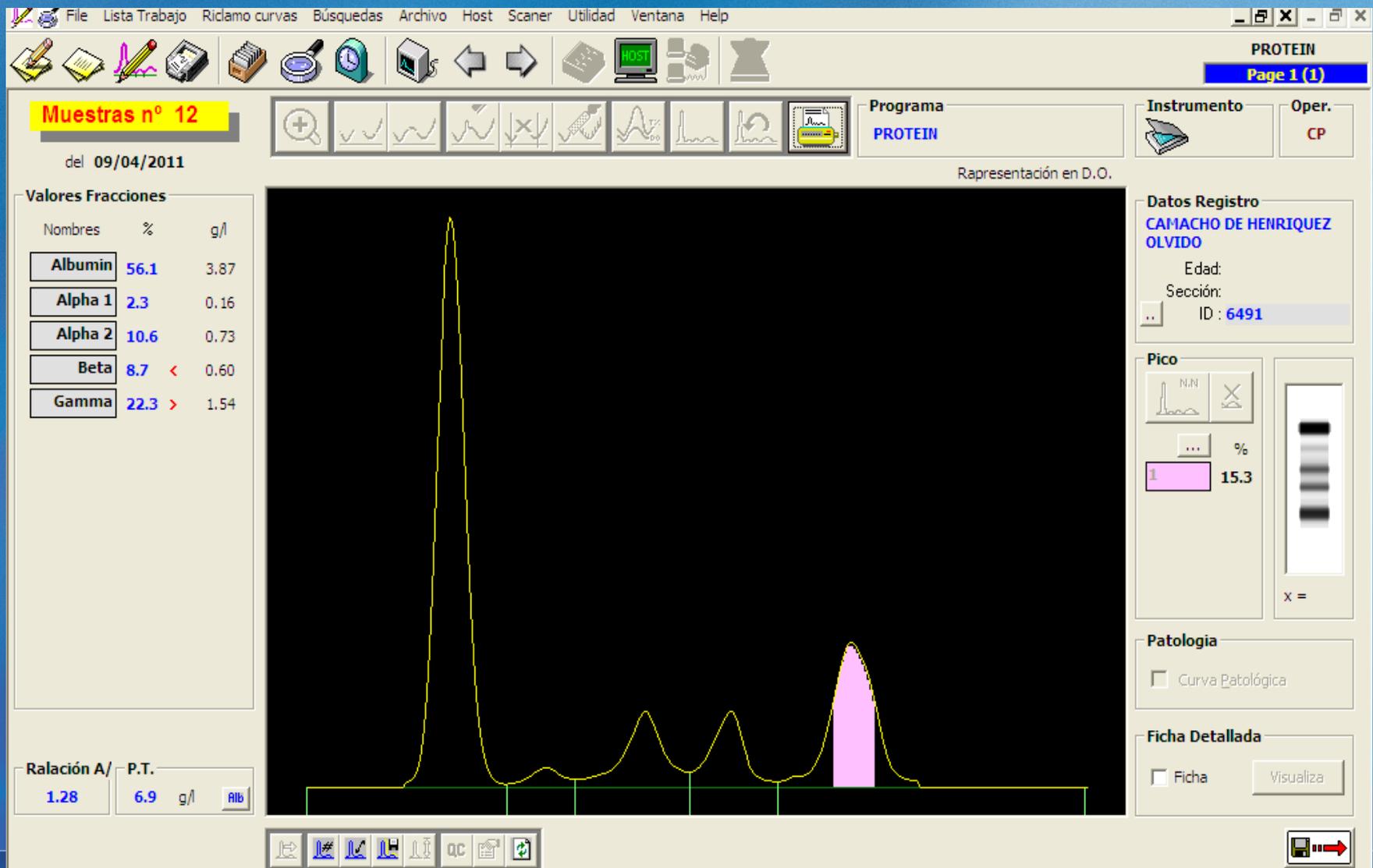


Fraciones	%	Ref. %	g/L	Ref. g/L
Albumina	62,2	55,8 - 66,1	44,78	40,20 - 47,60
Alfa 1	3,8	2,9 - 4,9	2,74	2,10 - 3,50
Alfa 2	8,5	7,1 - 11,8	6,12	5,10 - 8,50
Beta	18,3 >	8,4 - 13,1	13,18	6,00 - 9,40
Gamma	7,2 <	11,1 - 18,8	5,16	8,00 - 13,50
1	0,4		0,05	
A/G 1,65		PT: 72 g/L		

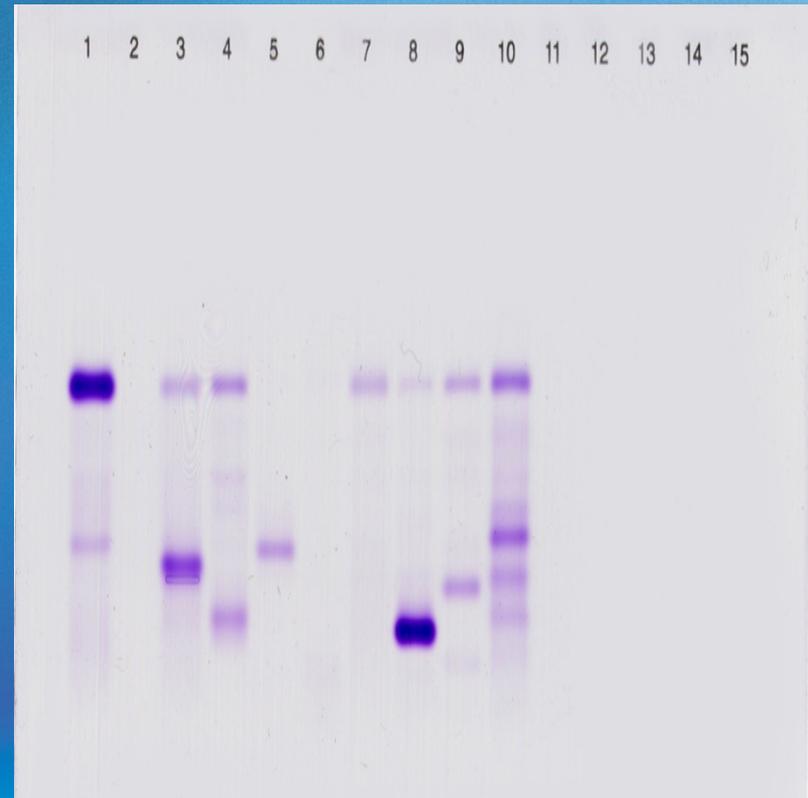
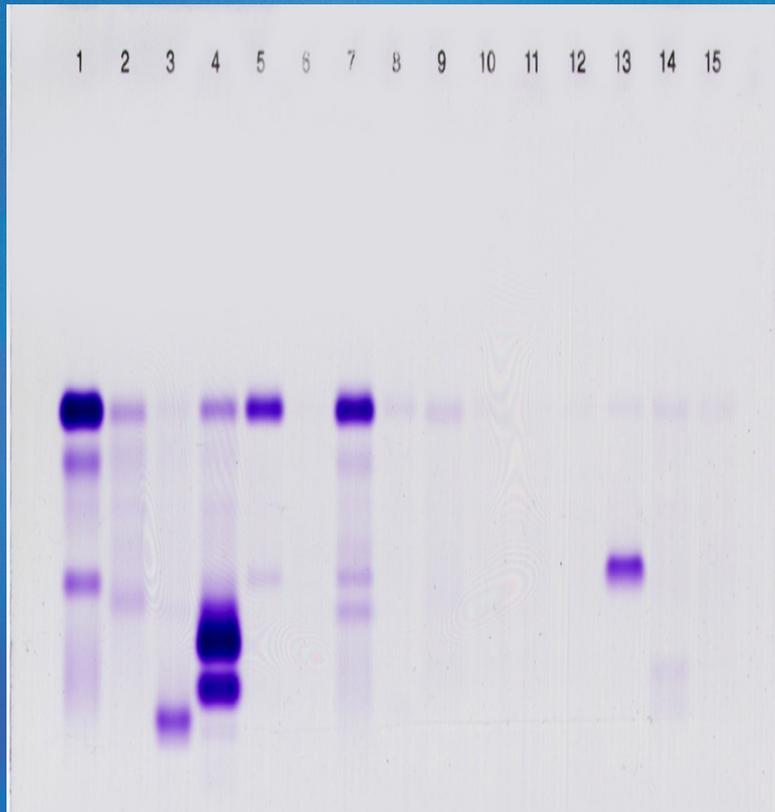
Resultado: Pico monoclonal en la fracción beta-2

Cuantificación del pico monoclonal interferida por el resto de proteínas que migran en la misma zona electroforética. Se recomienda seguimiento mediante **cuantificación de Ig A**

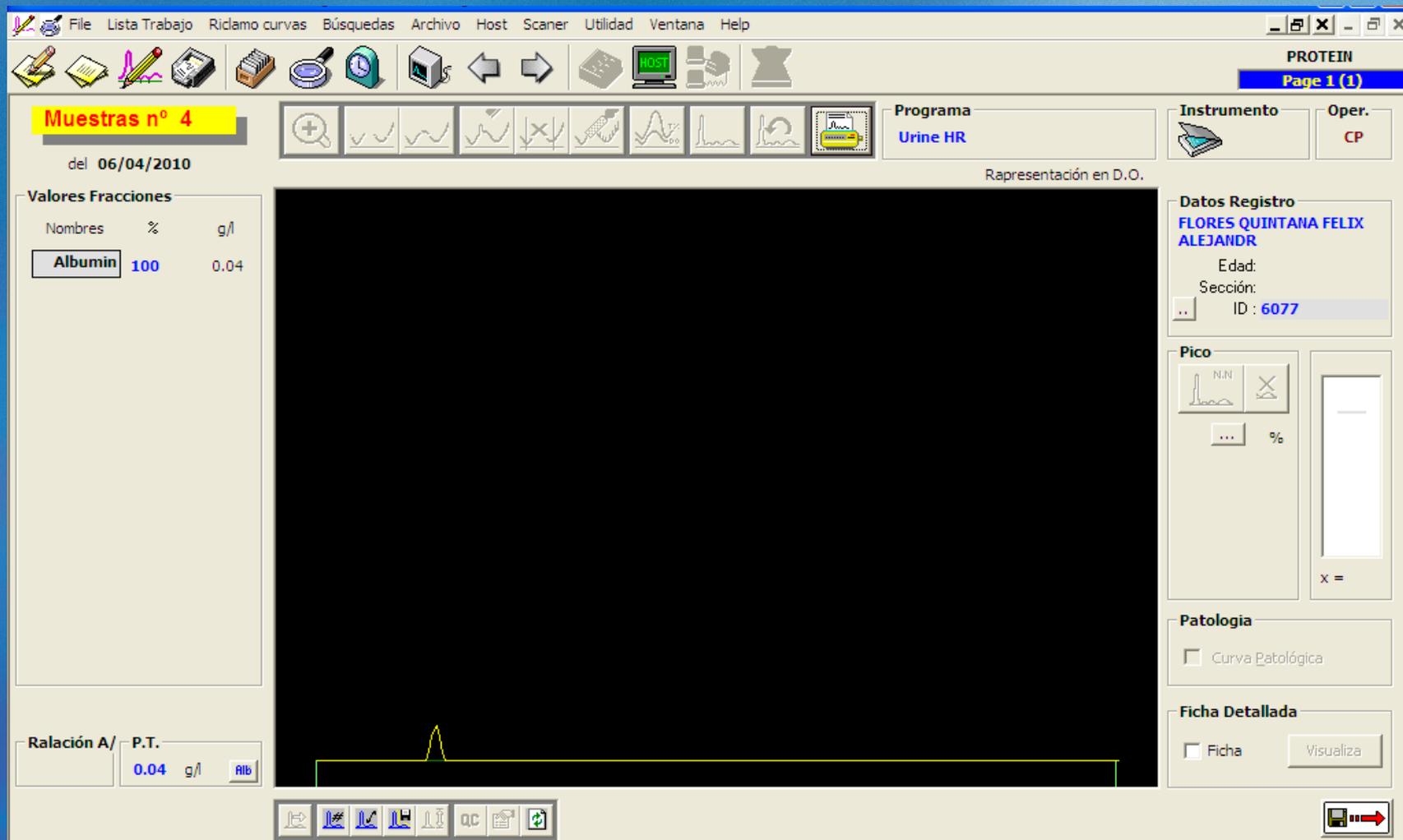
Algunos ejemplos

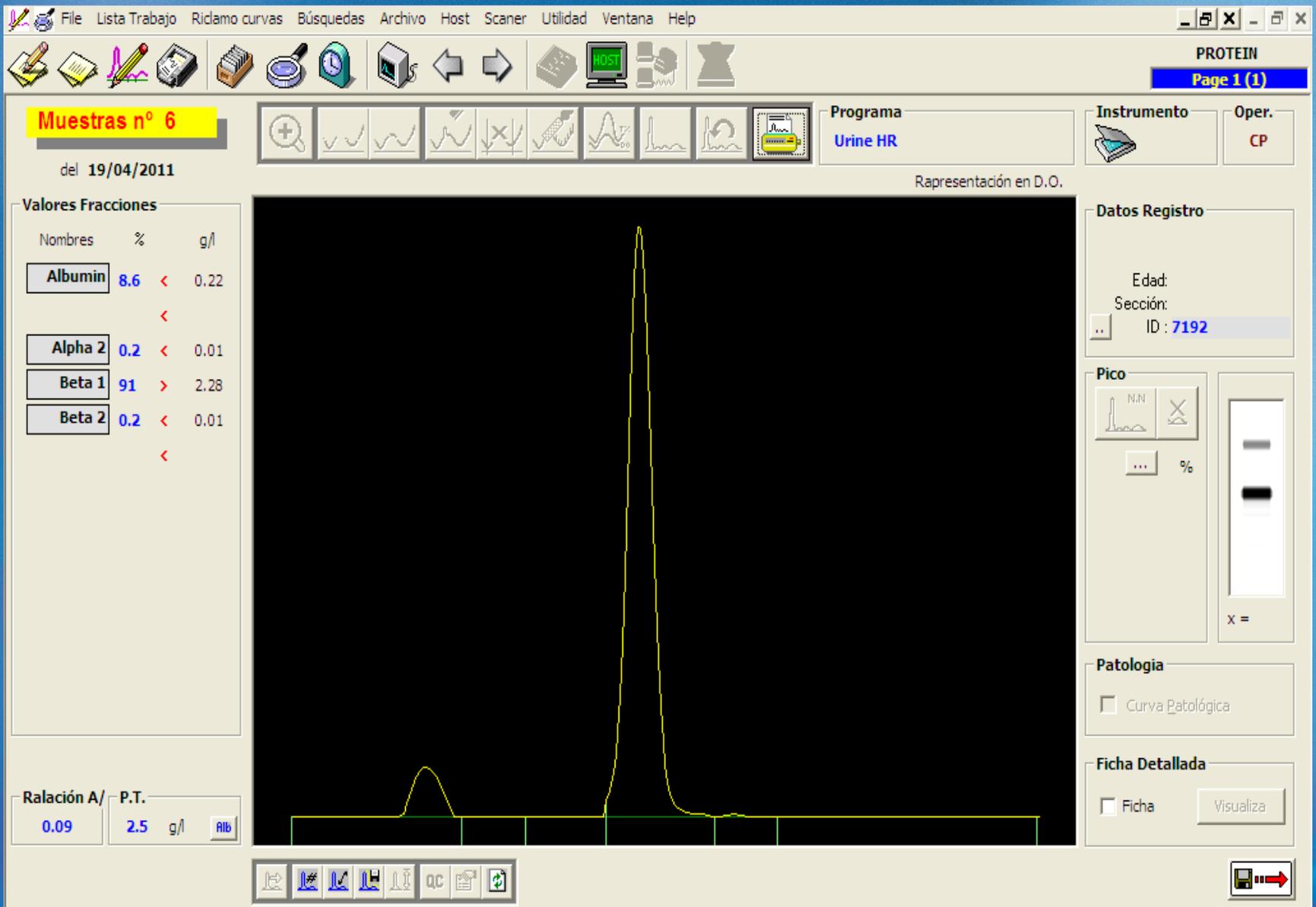


Electroforesis de zona en orina



Proteinograma normal en orina





MODELO DE PROTEINOGRAMA MONOCLONAL EN ORINA

Identificación del componente monoclonal

Cadenas pesada o ligera

Figura: 2 Multiplicidad y Heterogeneidad de las Inmunoglobulinas - Putnam, Vol. III, pag. 36

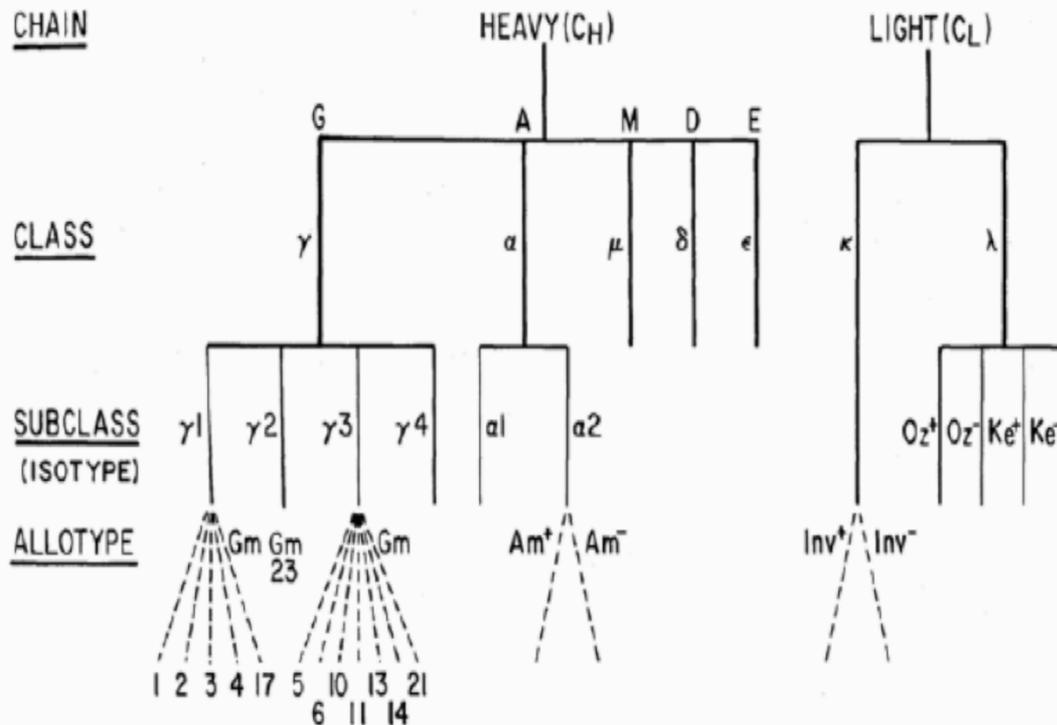


Fig. 9. Classes, subclasses, and allotypes of the heavy-chain (C_H) and light-chain (C_L) constant regions. Subclass and allotype designations are defined in the text (from Putnam, 1972b). The abbreviations Ke⁺ and Ke⁻ signify the Kern⁺ and Kern⁻ isotypes.

■ Ig G, Ig D e Ig E
forma molecular
monomérica.

■ Ig A
forma monómeros o dímeros.

■ Ig M
forma pentamérica.

Métodos de identificación del CM

● Inmunofijación

- Combina electroforesis de zona con inmunoprecipitación
- Separa proteínas por electroforesis, empleando luego antisueros monoespecíficos
- Si el antígeno está presente se forma una banda de inmunoprecipitación característica
- Sensibilidad analítica de 150-500 mg/L



INMUNOFIJACION

MUESTRA No.	COMPONENTE MONOCLONAL		LIMITE DE DETECCIÓN (g/l)	
	TIPO	CONC. (g/l)	HYDRAGEL 4 IF VIOLETA ÁCIDO	HYDRAGEL 4 IF NEGRO AMIDO
1	gamma	10,9	0,12	0,12
	kappa		0,12	0,12
2	gamma	7,8	0,12	/
	lambda		0,12	/
3	alfa	5,8	0,12	0,25
	lambda		0,12	0,25
4	mu	3,4	0,12	0,12
	lambda		0,12	0,12

Según la posición de la banda monoclonal, el fondo policlonal de la fracción de las gammaglobulinas y el colorante usado, el límite de detección de una paraproteína puede variar de 0,12 a 0,25 g/L.

INMUNOFIJACION

Etapas:

1. Separación de proteínas mediante electroforesis en gel de agarosa.
2. Inmunofijación (inmunoprecipitación) de las proteínas separadas : Los carriles de migración electroforética apropiados son recubiertos con antisueros individuales, que difunden dentro del gel y precipitan los antígenos correspondientes.
3. Las proteínas del carril de referencia son fijadas con una solución fijadora.
4. Proteínas no precipitadas se eliminan del gel mediante un blotting y un lavado.
5. La precipitación del complejo antígeno-anticuerpo queda fijada en la matriz del gel
6. Los precipitados y las proteínas fijadas son visualizadas mediante tinción

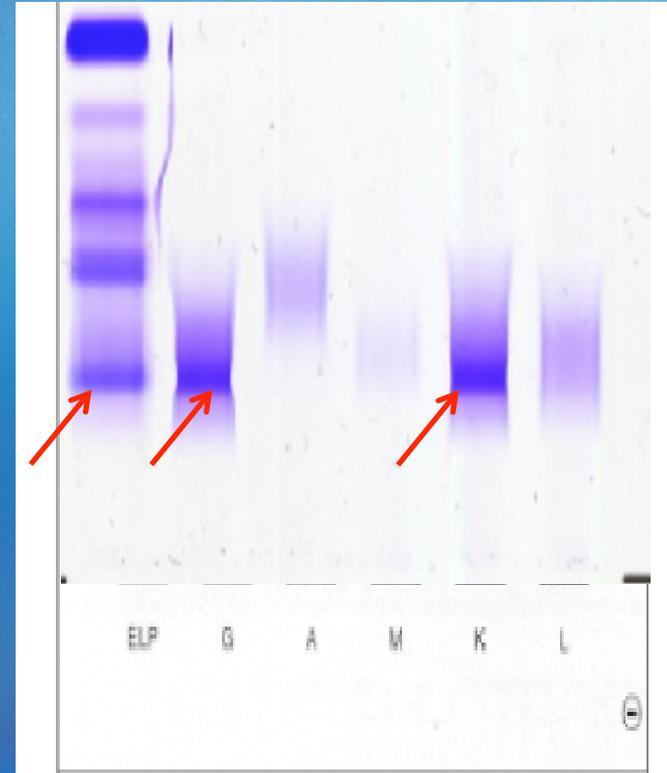
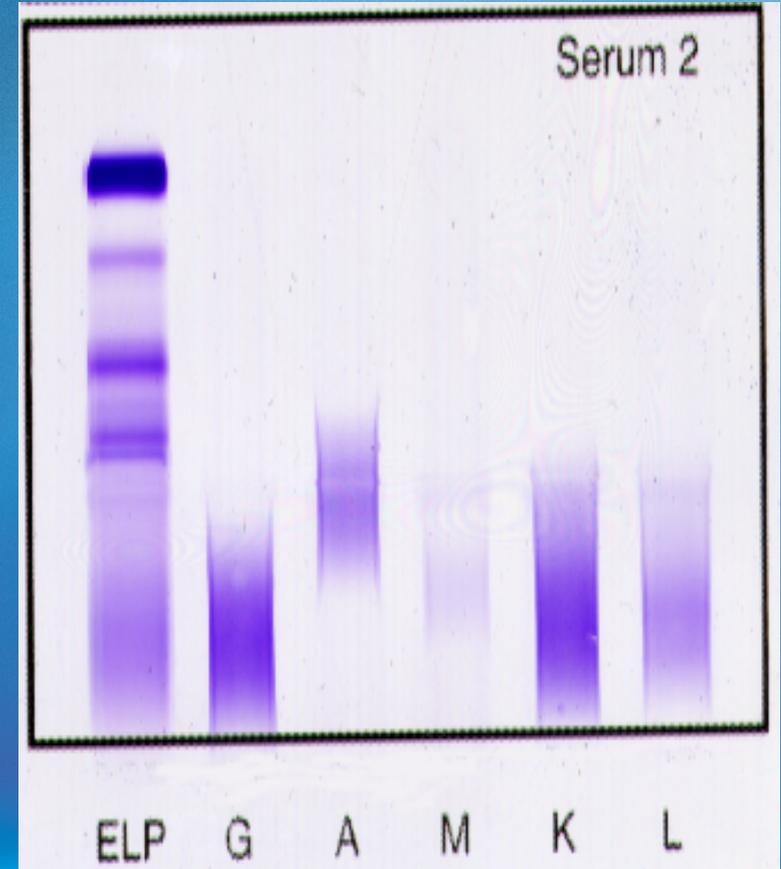
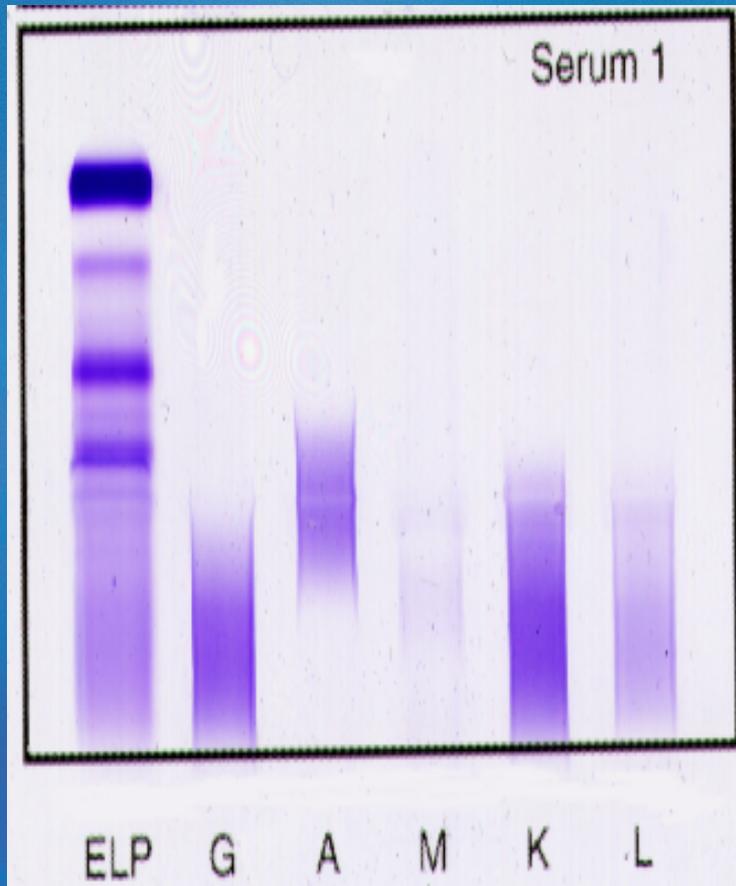


Fig.1 - En la figura se observa un componente Monoclonal que corresponde a IgG-Kappa

PATRON NORMAL DE INMUNOFIJACION

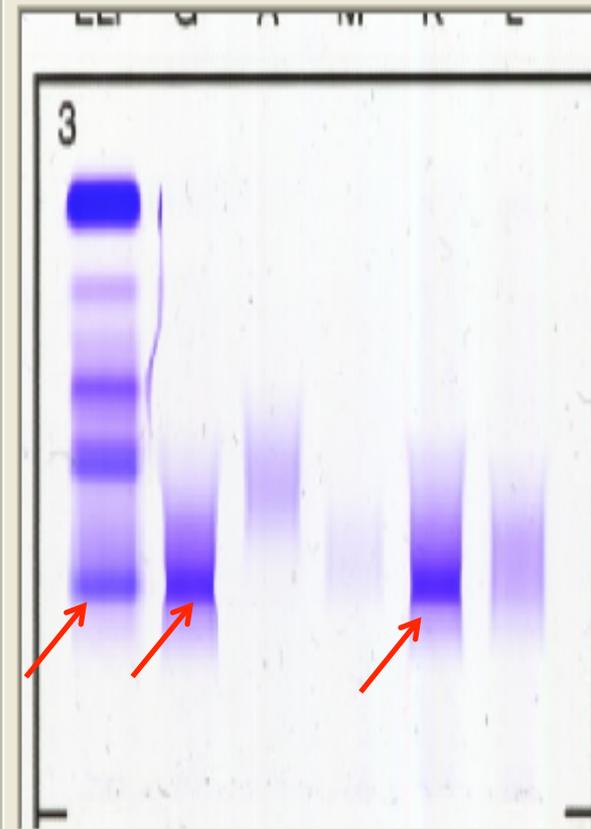


Datos Registro

Dosis de las proteínas específicas

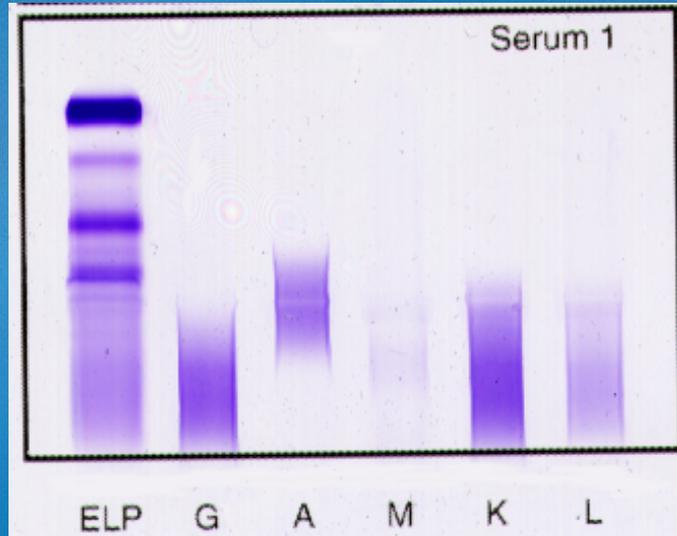
IgG	<input type="text" value="1397"/>	mg/dl	Alf1AG	<input type="text"/>	C4	<input type="text"/>	Trf	<input type="text"/>
IgA	<input type="text" value="155"/>	mg/dl	AT III	<input type="text"/>	Fib	<input type="text"/>	ApoA-1	<input type="text"/>
IgM	<input type="text" value="90"/>	mg/dl	Alf2M	<input type="text"/>	Cryo	<input type="text"/>	Trf tau	<input type="text"/>
IgD	<input type="text"/>		K free	<input type="text"/>	Alb	<input type="text"/>	K tot	<input type="text"/>
IgE	<input type="text"/>		L free	<input type="text"/>	HP	<input type="text"/>	L tot	<input type="text"/>
Alf1AT	<input type="text"/>		C3	<input type="text"/>	PreAlb	<input type="text"/>	R K/L	<input type="text"/>

IMAGEN

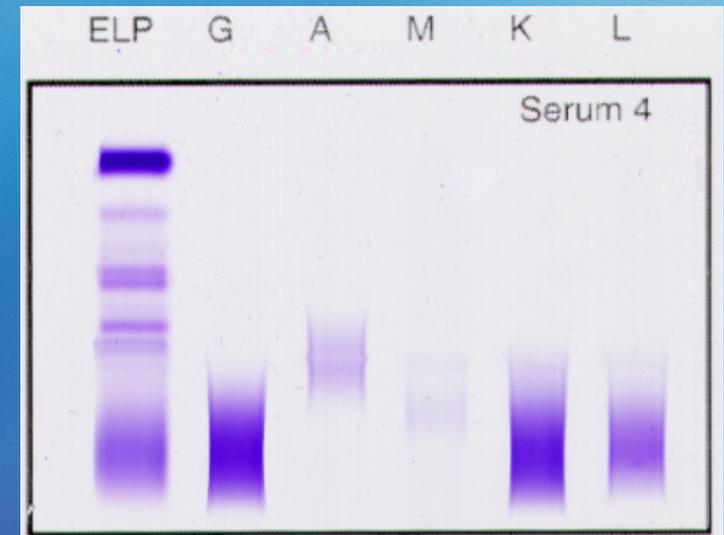
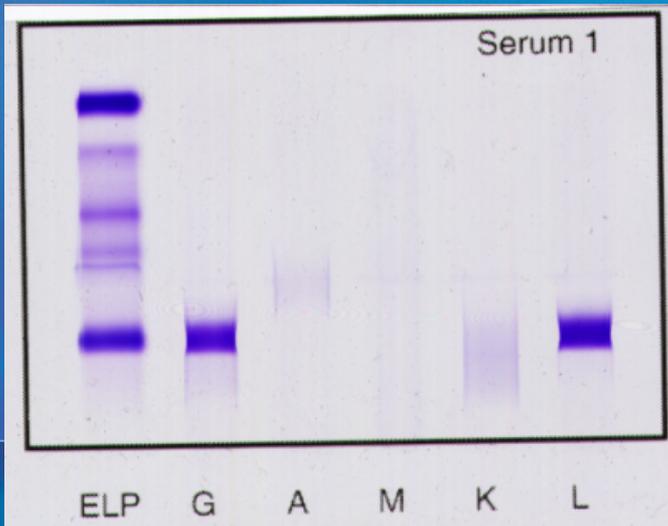


Electroforesis de Proteínas en suero e Inmunofijación

Suero Normal

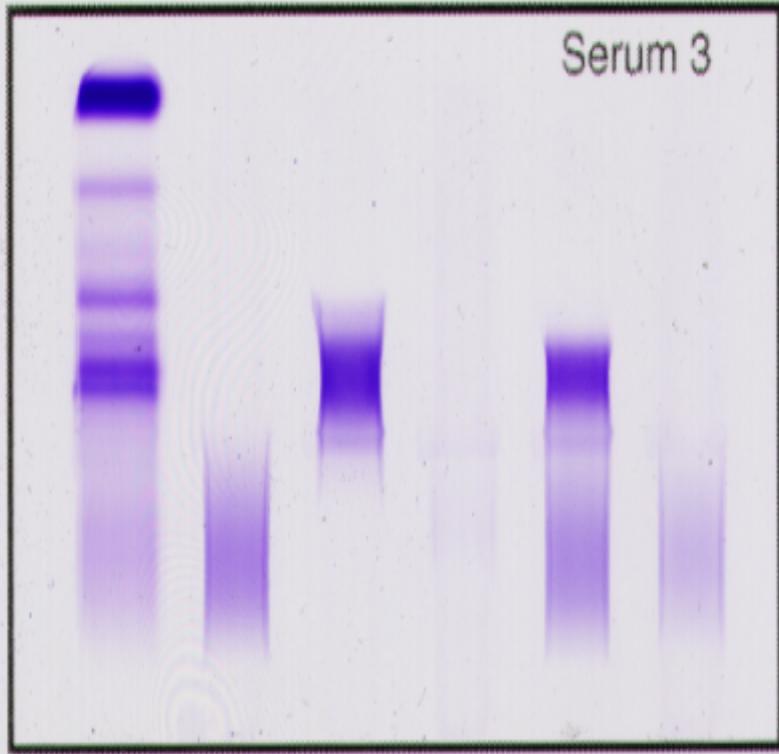


Mieloma Múltiple

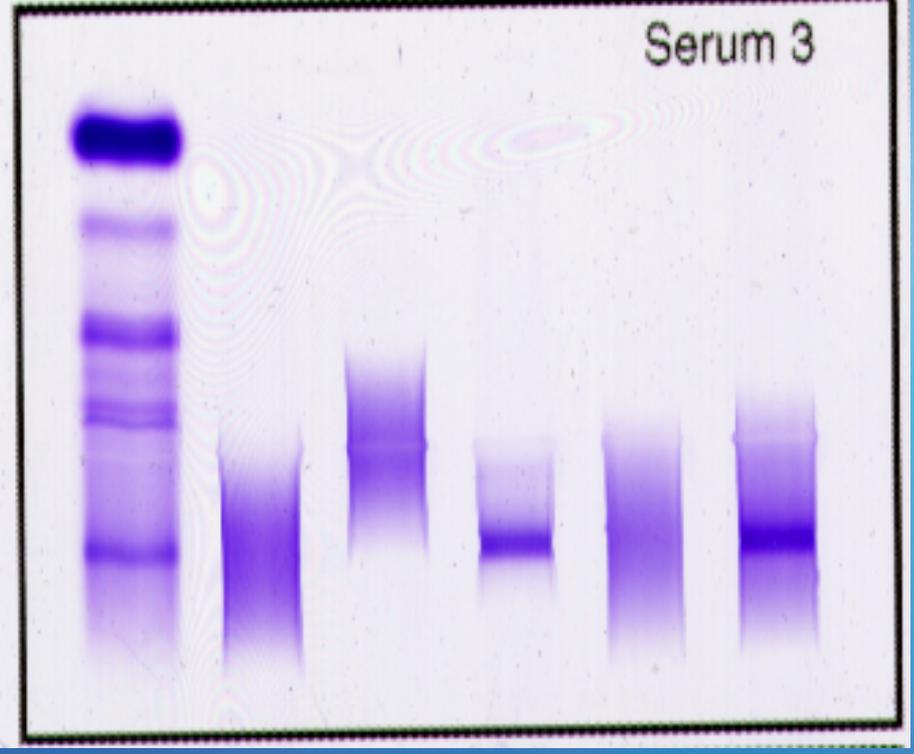


Hipergammaglobulinemia
policlonal

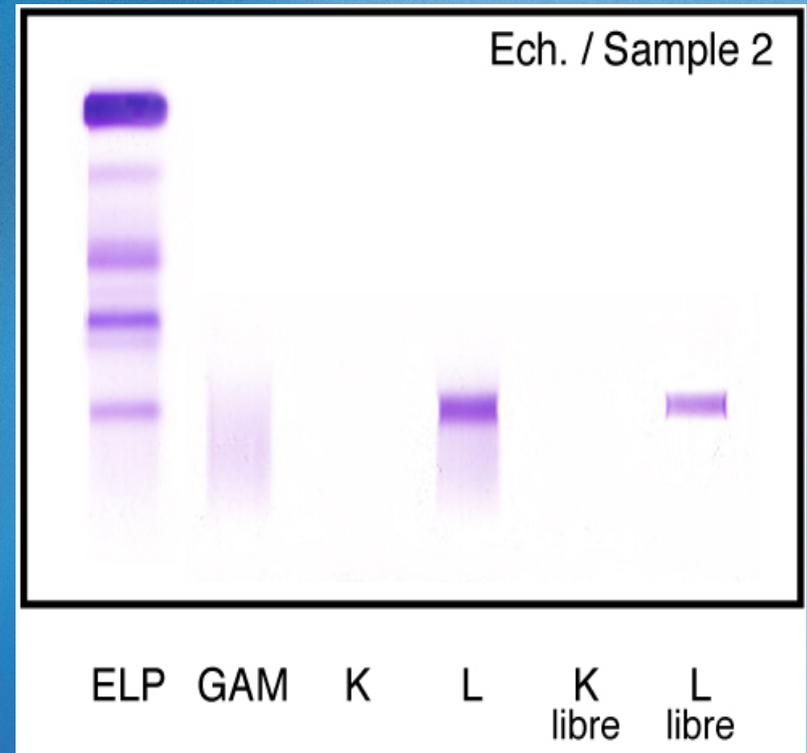
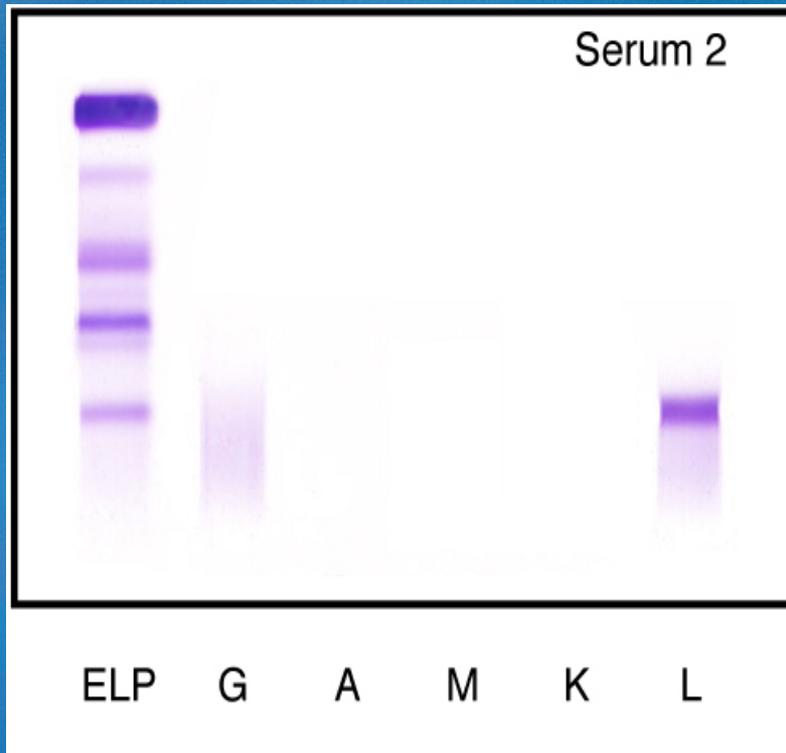
ELP G A M K L



ELP G A M K L



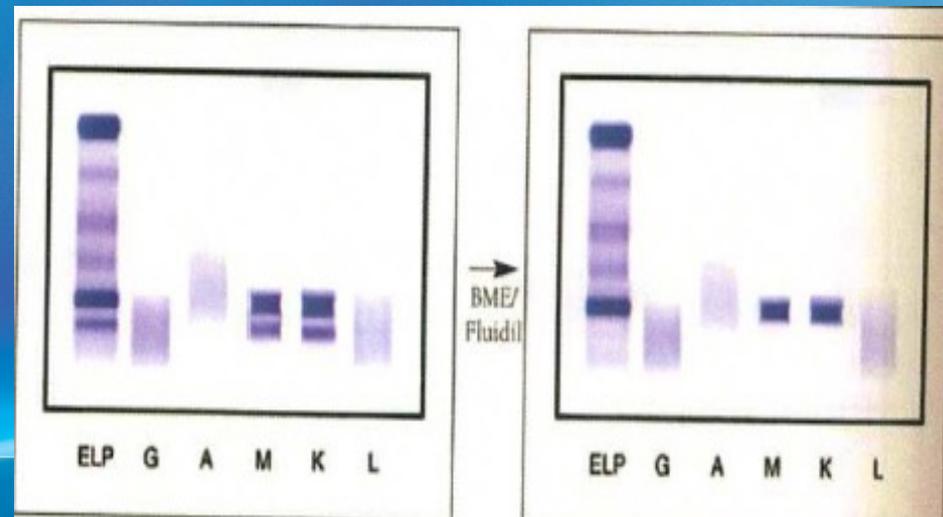
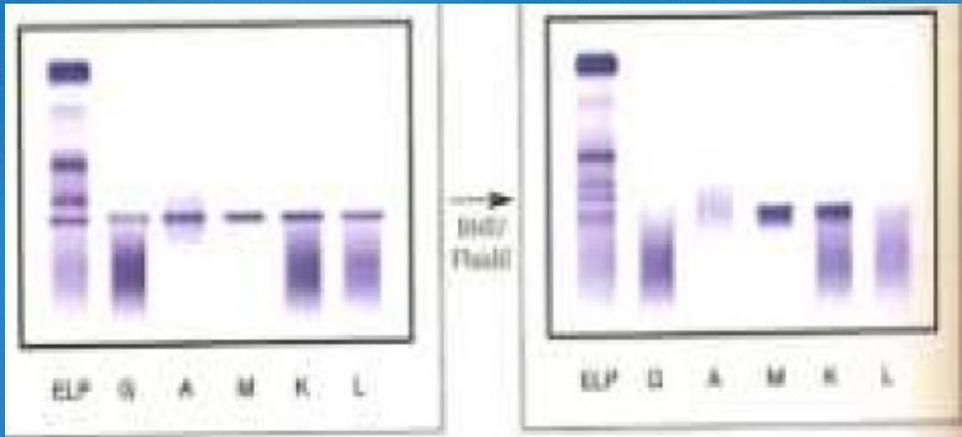
INMUNOFIJACION



Componente monoclonal tipo cadena ligera lambda. Se busca determinar si corresponde a una cadena ligera libre o es parte de otra Ig no evaluada aquí (Ig D o Ig E)

Limitaciones

- Descartar fenómenos de polimerización



INMUNOFIJACIÓN: APLICACIONES

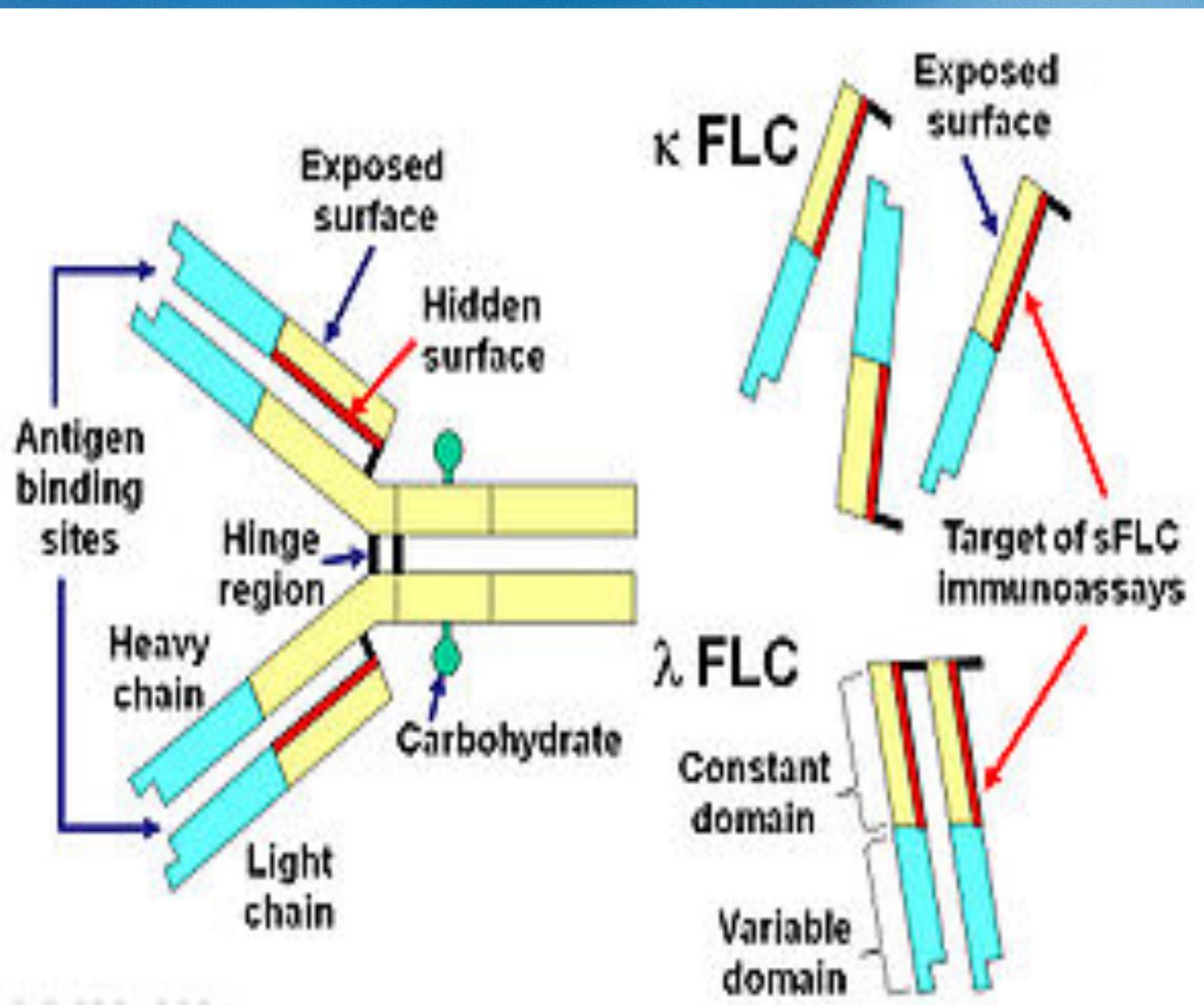
- Sospecha de proteína monoclonal de cadena pesada o ligera simple
- Esclarecimiento de bandas enmascaradas.
- Identificación de proteína de Bence Jones en orina.
- Búsqueda de proteínas monoclonales luego de desaparición en proteinograma por tratamiento.
- Reconocimiento de gammapatía biclonal.
- Criterio diagnóstico estricto y de remisión completa

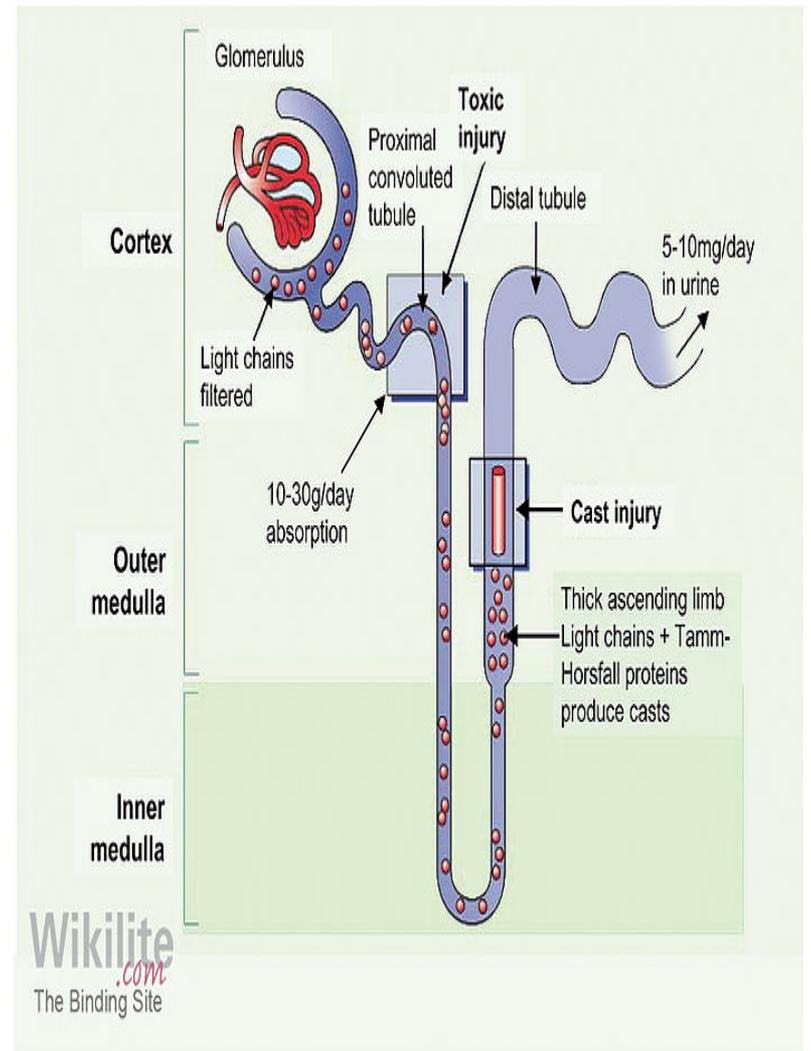
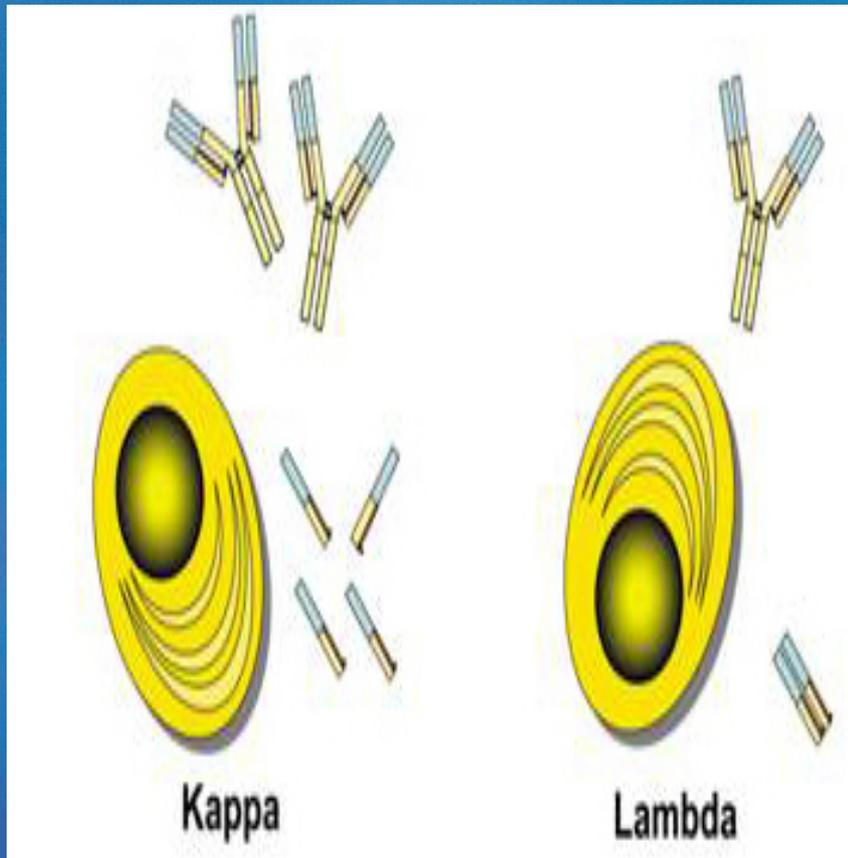


CUANTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS CADENAS LIBRES POR NEFELOMETRÍA /TURBIDIMETRÍA

- La nefelometría es una técnica inmunológica que evidencia si una proteína esta presente en la muestra y en que concentración pero no es capaz de prever la distribución ni la clonalidad
- Alta sensibilidad. Detecta concentraciones inferiores a 1 mg/L de IGS kappa y lambda en comparación con los 150-500 mg/L de la IFE y los 500-2000 m/L de la electroforesis







Precauciones

Siempre chequear las unidades (mg/l, mg/dl)

Considere:

- ✓ Exceso de antígenos
- ✓ Polimerización
- ✓ Variación de lote a lote
- ✓ No hay dilución lineal
- ✓ Impacto de la disfunción renal
- ✓ Impacto de las terapias en curso



Serum Reference Intervals and Diagnostic Ranges for Free κ and Free λ Immunoglobulin Light Chains: Relative Sensitivity for Detection of Monoclonal Light Chains

JERRY A. KATZMANN,^{1*} RAYNELL J. CLARK,¹ ROSHINI S. ABRAHAM,¹ SANDRA BRYANT,¹
JAMES F. LYMP,¹ ARTHUR R. BRADWELL,² and ROBERT A. KYLE¹

Background: The detection of monoclonal free light chains (FLCs) is an important diagnostic aid for a variety of monoclonal gammopathies and is especially important in light-chain diseases, such as light-chain myeloma, primary systemic amyloidosis, and light-chain-deposition disease. These diseases are more prevalent in the elderly, and assays to detect and quantify abnormal amounts of FLCs require reference intervals that include elderly donors.

Conclusions: Reference and diagnostic intervals for serum FLCs have been developed for use with a new, automated immunoassay that makes the detection and quantification of monoclonal FLCs easier and more sensitive than with current methods. The serum FLC assay complements IFE and allows quantification of FLCs in light-chain-disease patients who have no detectable serum or urine M-spike.

© 2002 American Association for Clinical Chemistry

COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES ENSAYOS EXISTENTES PARA LA MEDICIÓN

	VENTAJAS	DESVENTAJAS
PROTEÍNAS TOTALES EN ORINA	Simple, barato, ampliamente usado	Sensibilidad inadecuada para detección de cadenas ligeras libres
TIRAS REACTIVAS DE ORINA	Simple, barato, ampliamente usado	Sensibilidad inadecuada para detección de cadenas ligeras libres
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN SUERO	Simple, método manual/ semiautomatizado bien establecido, barato, bandas monoclonales se visualizan Resultado "cuantitativo" con scanner	Poco sensible (500-2,000 mg/L) No puede detectar cadenas ligeras libres a bajas concentraciones Interpretación subjetiva de los resultados
ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN ORINA	Simple, método manual/ semiautomatizado bien establecido, barato, bandas monoclonales se visualizan Resultado "cuantitativo" con scanner	Interpretación subjetiva de los resultados La orina puede requerir concentración con posible pérdida de proteínas Bandas falsas en orinas concentradas Proteinuria pesada obscurece resultados Requiere colectar orina de 24 hrs
ELECTROFORESIS DE INMUNOFIJACION EN SUERO Y EN ORINA	Bien establecida Buena sensibilidad en suero y muy sensible en orina concentrada (5-30 mg/L)	No es cuantitativa Sensibilidad en suero (150 mg/L) inadecuada para niveles séricos normales Técnica manual, semiautomatizada Antisueros costosos
ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA	Tecnología nueva automatizada cuantitativa	Menos sensible (400 mg/L) que la electroforesis de inmunofijación para el suero
K/L TOTAL	Inmunoensayo automatizado	Sensibilidad (>1000 mg/L) inadecuada par detectar pacientes con mieloma múltiple de cadenas ligeras

NIVELES DE SENSIBILIDAD ANALITICA REPRESENTATIVA DE ENSAYOS COMUNMENTE USADOS PARA CUANTIFICAR CADENAS LIGERAS

	KAPPA	LAMBDA	REQUERIMIENTOS DIAGNOSTICOS
<i>ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN SUERO</i>	500-2000 mg/L	500-2000 mg/L	<i>Banda Monoclonal</i>
<i>ELECTROFORESIS DE INMUNOFIJACION</i>	150-500 mg/L	150-500 mg/L	<i>Banda Monoclonal</i>
CADENAS LIGERAS LIBRES	1.5 mg/L	3.0 mg/L	<i>Razón K/L ANORMAL</i> 0.26-1.65 <i>rango renal (0.37-3.1)</i>

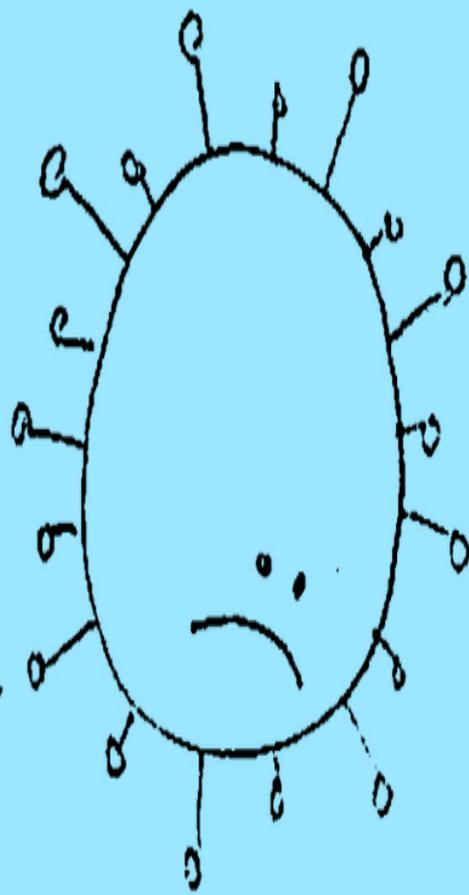
Tabla 2. Sensibilidad de los diferentes protocolos de diagnóstico para gammopatías monoclonales. La mayor sensibilidad es obtenida con el protocolo de EPS, CLL e sIFE realizadas en paralelo. Notar que para lograr una mayor sensibilidad diagnóstica es suficiente realizar análisis en suero, sin necesidad de utilizar muestras de orina de 24 horas. Las recomendaciones del IMWG para el tamizaje de una gammopatía monoclonal indican que la IFE en orina de 24 horas puede ser realizada para los casos de fuerte sospecha de AL de ser negativo el algoritmo en suero. Adaptado de A.R. Bradwell. Serum Free Light Chain Analysis (plus Hevylite). 6th ed. 2010.

Protocolo	MM	AL	MMCL	MMNS	GMSI
EPS	90%	50%	45%	0%	45%
EPS + sIFE	95%	70%	75%	0%	80%
EPS + EPO	95%	75%	90%	0%	70%
EPS, EPO, sIFE + uIFE	97%	90%	95%	0%	80%
CLL	96%	95%	100%	68%	65%
EPS + CLL	99%	98%	100%	68%	85%
EPS, CLL + sIFE	99%	99%	100%	68%	100%



Tabla 5. Recomendaciones del IMWG para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de pacientes con gammapatías monoclonales.

<i>Recomendación del IMWG</i>	
Cribado (diagnóstico diferencial)	El ensayo de CLL en suero debe ser usado conjuntamente con EPS e IFE en el cribado de patologías plasmaproliferativas monoclonales, con la excepción de AL para la cual se requiere también una IFE en orina de 24 horas.
Pronóstico	Se recomienda que los niveles basales de CLL sean determinados al momento del diagnóstico de todos los pacientes con GMSI, MM, MMA, plasmocitoma solitario y AL.
Monitoreo	El ensayo de CLL en suero está recomendado para el monitoreo cuantitativo de pacientes con AL, MM oligosecretor y MMNS. El ensayo de CLL en suero debe ser realizado periódicamente para el monitoreo de un posible escape de cadena liviana. Es necesario determinar los valores basales de las CLL antes del inicio de cualquier régimen quimioterápico para todos los pacientes con MM de modo de poder determinar que se alcanza una respuesta completa estricta cuando se obtiene una RC.



GRACIAS