

Diagnóstico Bioquímico

Fraccionamiento proteico por electroforesis capilar

Raquel Osatinsky *
* Bioquímica
Especialista en Química Clínica: Orientación Proteínas
Directora del Depto. de Docencia e Investigación y
Jefa del Área Proteínas de MANLAB
M.T. de Alvear 2263
Dirigir correspondencia a:
rosatinsky@emanlab.com.ar
docencia@emanlab.com.ar

Introducción

La electroforesis capilar (EC) separa moléculas proteicas cargadas en función de su movilidad electroforética,

en un buffer a un pH dado según el punto isoeléctrico (pI) del electrolito, y un flujo electrosmótico más o menos importante. Se la considera un método intermedio entre la electroforesis de zona clásica (sobre soporte de acetato de celulosa y/o agarosa) y la cromatografía líquida.

Es un método totalmente automatizado. Son dos empresas las que cuentan con éstos tipos de equipos, Beckman y Sebia. En el laboratorio contamos con el Capillarys 2 de Sebia, que emplea el principio de electroforesis capilar en solución libre. Tiene ocho capilares que funcionan en paralelo, permitiendo realizar ocho determinaciones simultáneas.

El uso de capilares para la separación electroforética



PUEDE SER UNO MAS O SIMPLEMENTE... DIFERENCIARSE.

Instrumento con sistema de detección por "flash" quimioluminiscencia y fase sólida de microparticulas paramagnéticas. Importante menú de reactivos: enfermedades infecciosas (TORCH – Epstein Barr, hepatitis A y B, Borrelia, Varicela Zoster), metabolismo mineral y óseo, función adrenal, tiroides, fertilidad, hipertensión, crecimiento, oncología, cardiología, diabetes, sepsis y autoinmunidad.

DiaSorin **LIAISON**

WM ARGENTINA SA

mejorando la vida a cada instante

WERFEN
MEDICAL

Carlos Pellegrini 1141, 7° piso. Bs. As., Argentina
Tel.: 54 11 4327 0099 / Fax: 54 11 4322 0834
info@werfen.com.ar / www.werfen.com.ar

CAPILLARYS 2 SEBIA

ELECTROFORESIS CAPILAR, UN PASO SIEMPRE ADELANTE



Combinando la tecnología más actual e innovadora con la experiencia de sebia, **capillarys 2** ofrece un elevado nivel de prestaciones, conforme a los requerimientos y exigencias de los laboratorios de diagnóstico clínico.

**capillarys
sebia 2**



**Tecnología en flujo líquido por capilares, última generación en electroforesis.
Completo menú: proteínas, alta resolución (hr), immunotyping (if), cdt, hemoglobina.
Carga continua de tubos primarios, lector de código de barras incorporado.
8 migraciones de muestras simultáneas.
90 determinaciones por hora.
Sensibilidad superior.
Totalmente automatizado.**

sebia




BG Analizadores

BG ANALIZADORES S.A.
Aráoz 86 | C1414DPB
C. A. B. A. | Argentina
Tel: 54-11 4856-2024/5734/2876
Fax: 54-11 4856-5652
www.bgenalizadores.com.ar
bga@bgenalizadores.com.ar



tiene múltiples ventajas. Los capilares son anticonvectivos, razón por la que no es necesario el empleo de un gel como soporte. El calor generado por el paso de la corriente eléctrica, que daría lugar a problemas de temperatura, está muy reducido porque la disipación del calor es muy efectiva.

La inyección de la muestra (diluida) en los capilares se realiza en el ánodo por aspiración; la separación, aplicando una diferencia de potencial de varios miles de voltios (7.800), en los extremos de cada capilar. La detección directa de las proteínas se lleva a cabo a partir de los 200 nm, en el extremo catódico del capilar. Se emplea buffer alcalino y el orden de la migración de las proteínas es el siguiente: gammaglobulinas, globulinas beta 2, globulinas beta 1, globulinas alfa 2, globulinas alfa 1, albúmina y pre-albúmina (transtiretrina).

La detección de las fracciones proteicas es directa; no existen los pasos: secado, coloración y decoloración de las corridas electroforéticas como sucede con los soportes de acetato de celulosa y/o agarosa. La imagen similar a la de una electroforesis en agarosa que se observa al costado del monitor es virtual, (no existe).

Lo único válido es la curva que se observa en la pantalla del monitor que expresa realmente el fraccionamiento de las proteínas.

Objetivo

Comunicar la experiencia de un año de trabajo en el laboratorio con el equipo de electroforesis capilar en el fraccionamiento de las proteínas séricas. De mayo 2007 a abril 2008 se procesaron 57.900 muestras.

Para validar el equipo se trabajó en paralelo las mismas muestras con electroforesis en agarosa en el Hydrasis de Sebia (990 sueros), el método empleado hasta la fecha mencionada.

Asimismo, se procesaron muestras de individuos normales (de acuerdo a las normas internacionales establecidas) para obtener los valores de referencia de las distintas fracciones proteicas.

Observaciones

El método de elección para el estudio de las proteínas séricas en el laboratorio bioquímico clínico es el proteinograma electroforético (PE). Puede realizarse por métodos manuales y/o automatizados según la estructura y el volumen de trabajo de cada laboratorio, el soporte empleado está condicionado por el mismo motivo.

En la EC, a diferencia de los otros métodos, no existen los pasos correspondientes a coloración, decoloración y secado de la placa, pues no existe placa, sino que la lectura se realiza en forma directa sobre la muestra que circula en el

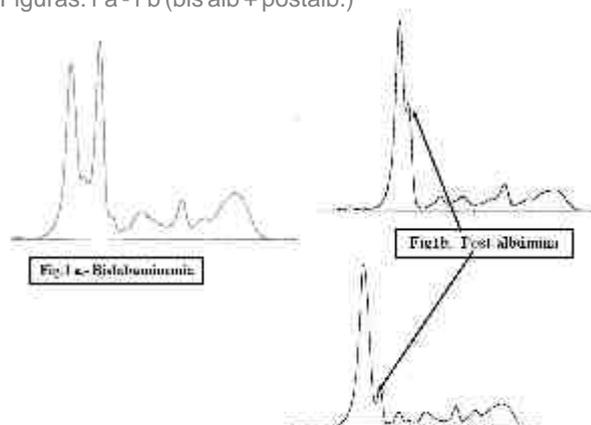
capilar del ánodo al cátodo. A la altura del cátodo, se encuentra el módulo de lectura, reflejándose la misma en el monitor del equipo como una curva similar a la de una densitometría.

En su momento (1996) el Comité de Expertos en Electroforesis señalaba: "La inspección visual de un proteinograma realizado por una persona entrenada, permite efectuar una evaluación semicuantitativa de las diversas fracciones proteicas, que dan una información clínica, que no se obtiene de otra manera". Esto sigue siendo válido cuando se efectúan PE con métodos de soporte como la agarosa y/o acetato de celulosa. No así en el caso de la EC, donde la inspección visual se efectúa sobre la curva, (que es la que corresponde a la corrida electroforética de una muestra dada).

Considerando que la EC realiza una lectura a partir de los 200 nm, marca algunas diferencias con las curvas obtenidas por la electroforesis en agarosa. La definición que se observa desde la zona de la albúmina permite la identificación de algunas fracciones que por otros métodos permanecen ocultas y/o incluidas dentro de alguna de las otras fracciones conocidas.

Comenzando con la zona de la albúmina, surge una de las primeras preguntas: ¿La bis-albuminemia es una rareza o depende de la sensibilidad del método empleado?

Figuras: 1 a - 1 b (bis alb + postalb.)



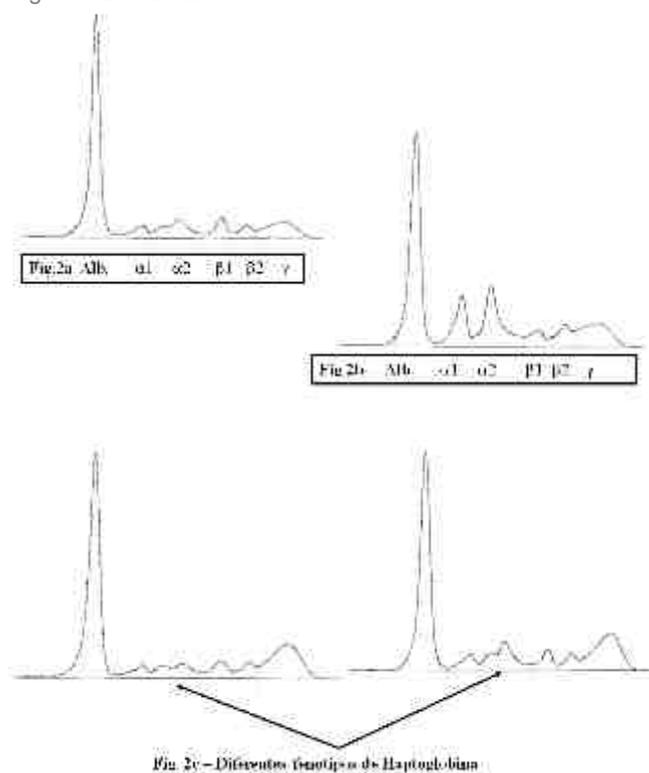
Por lo observado en las figuras advertimos con claridad, por un lado, la alteración genética y, por el otro, una de las funciones biológicas de la albúmina, su calidad de proteína de transporte. Por eso se puede observar presencia de post-albúminas y/o de picos que son más anchos desde la base.

De acuerdo a las pautas establecidas por los expertos, la fracción Alfa 1 debe observarse con claridad. Cuando se emplean soportes, esta fracción no es observable en caso de sueros envejecidos y/o cuando los buffers empleados son

muy reutilizados. La EC define la zona de las Alfa 1 con más amplitud, presenta una diferencia en los valores de referencia respecto de los otros métodos de alrededor de un 20%. Además, se puede visualizar más de una fracción en las curvas, en casos de algunos fenotipos de la Alfa 1 Antitripsina.

La fracción Alfa 2 también presenta diferencias con los métodos habituales. La curva es más ancha y los valores son más elevados. Identifica los distintos fenotipos de haptoglobina como puede observarse en la Fig. 2.

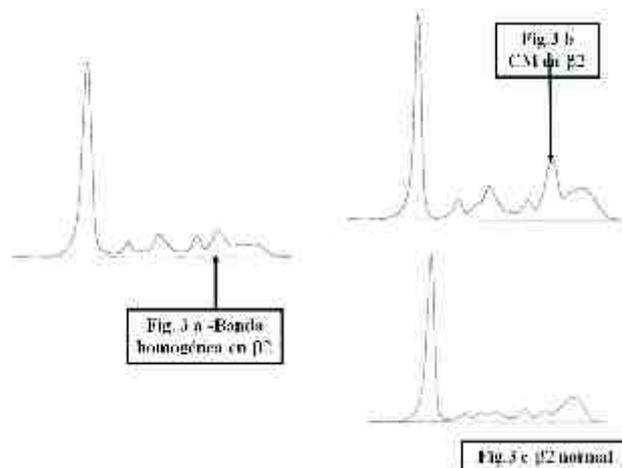
Figuras: 2 a - 2b - 2c



La zona de las Beta 1 y Beta 2 son de alta definición y se pueden observar las pequeñas alteraciones de la curva por presencia de componentes monoclonales (CM) de bajo tenor (tema de discusión en distintos ámbitos). Algunos sostienen que la EC no tiene sensibilidad para detectar esas fracciones. Por la experiencia adquirida, examinando aproximadamente 60.000 muestras de suero considero que se debe fundamentalmente a la falta de capacitación de las personas que realizan la validación de las curvas.

Es necesario tener presente, que cuando nos referimos a CM, independientemente del valor de las inmunoglobulinas involucradas en el mismo, es necesario realizar una inmunofijación en agarosa o emplear el Immunotyping, método que se efectúa por EC (basado en la inmunosustracción).

Figuras: 3 a - 3 b - 3 c

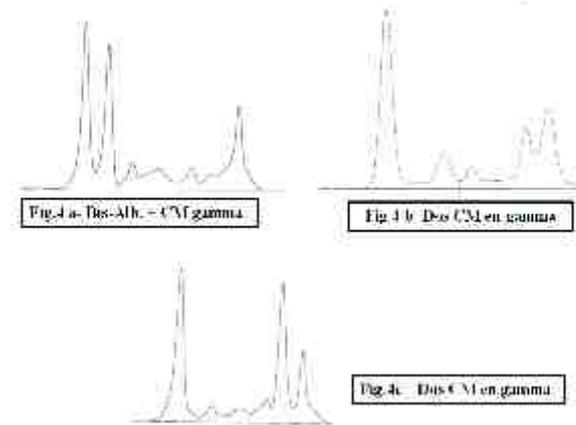


El estudio de las gammaglobulinas constituye una de las razones por las que se solicita generalmente un PE al laboratorio bioquímico. Examinando las curvas se pueden identificar:

- Una patente normal policlonal
- Una patente policlonal con gammas aumentadas
- Una patente oligoclonal con gammaglobulinas normales y/o aumentadas
- Presencia de tenues bandas homogéneas (pueden ser parte de una gammapatía oligoclonal y/o respuesta a algún tipo de tratamiento o estimulación antigénica)
- Banda homogéneas definidas sobre una patente policlonal
- Componentes monoclonales propiamente dichos

No voy a analizar cada uno de los puntos arriba mencionados, pues no es el objetivo de este trabajo, sino mostraré algunos pocos casos que puedan ejemplificar lo expuesto.

Fig. 4 a-b-y c





MINDRAY

Más que analizadores...

la solución a sus necesidades.

BC-2800

Analizador Hematológico Automático.

Diferencial de 3 poblaciones,
19 parámetros
+ 3 histogramas (RBC, WBC, PLT).
Velocidad: 30 muestras por hora.
Bajo costo de insumos.



BC-3000Plus

Analizador Hematológico Automático.

Diferencial de 3 poblaciones,
19 parámetros, + 3 histogramas (RBC, WBC, PLT).
Velocidad: 60 muestras por hora.
Bajo costo de insumos.



BC-5500

Analizador Hematológico Automático.

Diferencial de 5 poblaciones, 27 parámetros,
2 histogramas + 2 diagramas de dispersión.
Tecnología láser combinado con método
de tinción química, Citometría de Flujo.
Velocidad: 80 muestras por hora.
2 modos de medición: manual con tubo
abierto o cerrado y automático con Auto Sampler.
Capacidad de identificación de células anormales.
Lector de códigos de barras incorporado.
Gran pantalla de LCD sensible al tacto.

BS-200

Autoanalizador de Química Clínica.

200 Test por hora (sin ISE).
40 posiciones para reactivos
en compartimiento refrigerado.
40 posiciones para muestras.
Interface bi-direccional a
software de laboratorio.
Ideal para pequeños y
medianos laboratorios.



BS-300

Autoanalizador de Química Clínica.

300 Test por hora (sin ISE).
50 posiciones para reactivos
en compartimiento refrigerado.
60 posiciones para muestras.
Interface bi-direccional a
software de laboratorio.
Lector interno de código de
barras para muestras.

Representante exclusivo en Argentina

GEMATEC S.R.L.

Ricardo Gutiérrez 1357 PB A, (1636) Olivos, Buenos Aires, Argentina.

Tel/Fax: (011) 4794-7575/7676/3184/1289 - 4799-3551

E-mail: info@gematec.com.ar

GEMATEC

equipamiento para medicina



www.gematec.com.ar



Algunas conclusiones

La EC es una herramienta más de trabajo en el laboratorio bioquímico clínico. Es una tecnología de punta, totalmente automatizada, que desde el punto de vista operativo y científico-tecnológico brinda ventajas en laboratorios de alta complejidad y/o con gran número de muestras a procesar diariamente. Como toda nueva metodología el profesional debe conocerla y adaptarse a los cambios que la misma introduce en la rutina del trabajo del laboratorio. Deben aplicarse a este método todos los controles de calidad para validar las distintas fracciones proteicas, emplearlos con las corridas electroforéticas, para que el operador tenga una referencia y seguridad en la entrega de los resultados.

Así como en el empleo de la agarosa como soporte, la inspección visual es muy importante; en éste caso la interpretación y validación de la curva es una tarea similar. En la medida que más muestras se procesan y se leen, más seguridad adquiere el profesional.

En los casos de presencia de CM de baja, mediana o alta concentración, la indicación es la realización de la inmunofijación en agarosa que es el "gold standard" para identificar tipos e isotipos de cadenas pesadas y livianas, siendo este un método cualitativo.

Referencias Bibliográficas

- 1-Robert F, Bouilloux JP, Denoroy L.- L'electrophorese caillaire: principe et applications.- Ann Bio Clin 1991 ; 49: 137-148
- 2-Lissoir B, Wallemacq P, Malsin D.- Electrophorese des proteines sériques : comparaison de la technique en capillaire de zone Capillars (Sebia) el de l'electrophorese en gel d'agarose Hydrasys (Sebia).- Ann Biol Clin 2003 ; 61 : 557-62
- 3-Didier Le Carrer, Kalyane Bach-Ngohou.- L'electrophorese capillaire automatisee en biologie clinique.- Spectra Biologie 2005 ; N° 146
- 4-Kok W Th, Bruin GJM.- Capillary Zone Electrophoresis.- European Chrom News 1988;2: 22-26.
- 5-Henskens Y, De Winter J, Pekelharing M, Ponjee G.- Detection and identification of monoclonal gammopathies by capillary electrophoresis.- Clin Chem 1998; 44: 1184-1190
- 6-Gay- Bellile et. al. -Automated multicapillary electrophoresis for analysis of human serum proteins.- Clin Chem 2003, 49: 1909-1915
- 7-Honsson M and Carlson J.- Computer-supported interpretation of protein profiles after Capillary electrophoresis.- Clin Chem 2002; 48: 1084-1093
- 8-Narvaiza RC y col. - Inmunosustracción en fase homogénea: un nuevo procedimiento para la tipificación de componentes monoclonales en suero.-Revista de Diagnóstico Biológico 2006; 2: 87-94
- 9-Roudiere L et al.- Evaluation of capillary zone electrophoresis systems versus a conventional agarose gel system for routine serum protein separation and monoclonal component typing. - Clin Lab 2006; 52: 19-27
- 10-Luraschi et al.- Analytical variation in the measurement of serum monoclonal component by capillary electroforesis. Clin Chim Acta.- 2004;394: 151-6
- 11-Terreni A, Caldini A, et al.- Serum proteins capillary zone electrophoresis: A comparison of two systems.- Laboratory Medicine 2006; 37: 233-236



DESCANSE...

CL Analyzer, el sistema de mayor flexibilidad y simplicidad.

Menú de 5 ensayos (PT, APTT, Fibrinógeno de Clauss, Antitrombina y D-Dimer9). Diferentes unidades para el reporte de resultados, identificación de las muestras editable a través del teclado. 3 unidades de lectura: 2 de coagulación a 660nm y 1 cromogénico/látex a 405nm. 12 posiciones de incubación a 37°C. Mínimo consumo de muestras y reactivos. Impresora térmica incorporada. RS232 Serial interface.

...NOSOTROS NOS OCUPAMOS.



CL Analyzer

Ensayos coagulométricos, cromogénicos e inmunológicos

FÁCIL COMO USTED LO DESEA

PEQUEÑO COMO USTED LO NECESITA

LISTO PARA CUANDO USTED LO REQUIERE

WM ARGENTINA SA

mejorando la vida a cada instante



Carlos Pellegrini 1141, 7º piso. Bs. As., Argentina
Tel.: 54 11 4322 0099 / Fax: 54 11 4322 0834
info@werfen.com.ar / www.werfen.com.ar