



Método Automatizado para Tipificación de Componentes Monoclonales por Electroforesis Capilar (Immunotyping)

 10 min.



Este artículo presenta una técnica de separación electrocinética para tipificación de Componentes Monoclonales (CM). Se la considera una tecnología intermedia entre el soporte de zona y la cromatografía líquida. El sistema Capillarys 2 usa el principio de la electroforesis en solución libre, que es la forma más corriente de la Electroforesis Capilar. Separa las moléculas cargadas en función de su movilidad electroforética propia en un tampón de pH dado, según el pH del electrolito y de un flujo electro-endosmótico más o menos importante. La inmunotipificación se realiza empleando antisueros monoespecíficos anticadenas pesadas (IgG, IgA e IgM) y anticadenas livianas (κ y λ) de las inmunoglobulinas.



Raquel Osatinsky*, Vanesa P. Chavez**, Nieves Sainz***

* Bioquímica, Jefa del Dpto. de Proteínas de MANLAB

** Bioquímica

*** Estudiante de Bioquímica de la UAJFK



E-mail:

raquel.osatinsky@genesis-manlab.com.ar



Introducción

La electroforesis capilar es un método de separación electroforética en medio líquido, totalmente automatizado (EC). La inmunosustracción (IS) o inmunotipificación (IT), fue desarrollada en 1977 por Aguzzi y col. para identificar los componentes monoclonales (CM) y fue realizada sobre soporte de agarosa en forma manual empleando los métodos electroforéticos de la época.

Su aplicación a la identificación de CM se realizaba únicamente en laboratorios especializados dada la complejidad para la preparación de las placas de agarosa. Razón por cual no se difundió su uso en los laboratorios bioquímico clínicos.

La inmunofijación en agarosa (IF) para la tipificación de CM no es aplicable a la EC. En 1998 Bienvenu y col. aplican por primera vez la IS en la EC y a partir del 2000, se la aplica a los equipos totalmente automatizados de EC (Capillarys 2 Sebia), para la identificación y tipificación de cadenas pesadas y livianas de la inmunoglobulina intacta de los CM, denominando al método Immunotyping.

Método

Es una técnica de separación electrocinética realizada en un capilar de

diámetro interno inferior a 100 μ m, lleno de un tampón compuesto por electrolitos. La separación se realiza en medio alcalino (pH 9,9). Se la considera una tecnología intermedia entre el soporte de zona y la cromatografía líquida. El sistema Capillarys 2 usa el principio de la electroforesis en solución libre, que es la forma más corriente de la EC.

Separa las moléculas cargadas en función de su movilidad electroforética propia en un tampón de pH dado, según el pH del electrolito, y de un flujo electro-endosmótico más o menos importante.

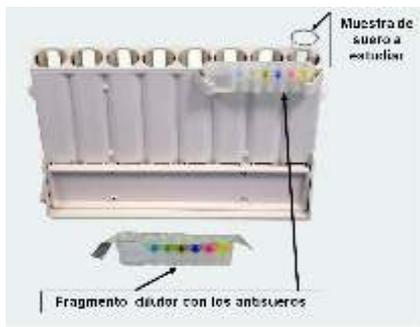
La inmunotipificación se realiza empleando antisueros monoespecíficos anticadenas pesadas (IgG, IgA, e IgM) y anticadenas livianas (κ y λ) de las inmunoglobulinas.

El Capillarys 2 realiza ocho electroforesis de suero en forma simultánea porque tiene esa cantidad de capilares, las muestras son aspiradas por presión negativa en el ánodo y su separación se realiza aplicando una diferencia de potencial de 7.800 voltios en los extremos de cada capilar. La detección directa de las proteínas se realiza en el extremo catódico, la lectura se efectúa a 200 nm y el tiempo de corrida es de cuatro minutos. Los capilares se lavan entre cada muestra con una solución de lavado y luego con el tampón empleado.

Para realizar el IT, el procedimiento es similar al de una EC, la diferencia reside en que se procesa una muestra por vez y el fragmento dilutor es el que contiene seis pocillos con los antisueros correspondientes. (Fig. 1)



Figura 1



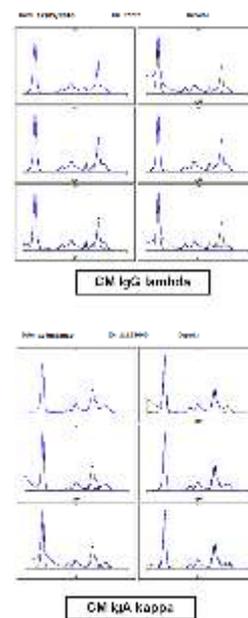
Se introduce en el equipo el "rack" con la muestra a analizar, colocando el fragmento dilutor que tiene los antisueros.

Todo el proceso es completamente automático, las etapas son:

1. Dilución del suero con un diluyente específico contenido en uno de los pocillos. La dilución se adapta a la concentración de inmunoglobulinas de la muestra.
2. Mezcla de la muestra diluida con los diferentes antisueros. El complejo antígeno - anticuerpo se forma rápidamente en el medio líquido sin etapa de incubación ni de precipitación.
3. La inyección de las muestras tratadas se realiza en los 6 capilares (en la parte anódica), seguida de separación electroforética de las proteínas en medio alcalino y la detección de las mismas en la parte catódica a 200 nm.
4. Se superponen los perfiles de la EC con los perfiles de los antisueros (IgG, IgA, IgM, kappa y lambda), que permite la caracterización de la proteína monoclonal. (Fig. 2)



Figura 2



Todo el proceso se realiza en 14 minutos.

BIO-RAD

Control de Calidad

Unity Real Time™

Quality Control

Controles valorados y no valorados.
Controles liofilizados y líquidos.
Multiparamétricos y especialidades.
Software Unity Web/Unity Real Time.
Informes interlaboratorios mensuales.
Control de calidad interno y externo.

- Inmunología
- Endocrinología
- Inmunosupresores
- Fertilidad
- Gases en Sangre
- Anemia
- Marcadores Óseos
- Drogas Terapéuticas
- Química Clínica
- Urianálisis
- Lípidos
- Hematología
- Reticulocitos
- Eritrosedimentación
- Torch
- Pediatría
- Etanol/Amonio
- Marcadores Cardíacos

- Isoenzimas
- Homocisteína
- Proteínas
- Factor Reumatoide
- Líquido Cefalorraquídeo
- Diabetes
- Hemoglobina Glicosilada
- Marcadores Tumorales
- Toxicología

- Marcadores de Infección
- Compuestos Volátiles
- Metales en Orina
- Catecolaminas
- Coagulación y Hemostasia
- Paneles de Seroconversión
- Autoinmunidad

BIODIAGNOSTICO

Biodiagnostico S.A.

Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" - C1107APB - Buenos Aires - Argentina - Tel./Fax: (+54 11) 4300-9090

Info@biodiagnostico.com.ar - www.biodiagnostico.com.ar

Interpretación

Es la etapa más importante y relativamente sencilla. Debe considerarse que es un método poco conocido y que su aplicación puede ser efectuada tan solo por los laboratorios que trabajen con EC.

Como el principio del método de IT es la sustracción, el pico que no se observa es el correspondiente al CM. Es decir, que el método se caracteriza por la desaparición de un pico con uno de los antisueros anticadenas pesadas y con uno de los antisueros anticadenas livianas. La fracción monoclonal detectada debe estar situada en la misma posición de migración que la banda detectada en el perfil de la EC (Fig. 2). Esta imagen se observa en la pantalla del monitor donde la curva original parece superpuesta con la de cada uno de los antisueros.

En presencia de varios CM, se aplica la misma interpretación. Estos casos, no tan frecuentes, se corresponden con la desregulación de dos o más clones de células B. Una gammopatía biclonal se detecta por la presencia de la sustracción de dos cadenas pesadas, iguales o diferentes, y de dos cadenas livianas (iguales o diferentes).

La desaparición de varios picos con uno de los antisueros anticadenas pesadas y anticadenas livianas, nos indica que existe una polimerización de las inmunoglobulinas involucradas en los CM que se observan en la EC. En éstos casos es necesario realizar un tratamiento reductor con beta-mercaptoetanol y repetir el análisis; la interpretación permitirá dilucidar si se trata de una bi, triconalidad o si es tan solo un CM (Fig.3)



Figura 3



PIPETAS, QUIMICA CLINICA, TESTS RAPIDOS

REACTIVOS LIQUIDOS ESTABLES PARA QUIMICA CLINICA



Durante más de 35 años, HUMAN ha servido al sector de asistencia sanitaria. HUMAN desarrolla y fabrica en Alemania productos de diagnóstico de laboratorio para el mercado mundial. El nombre HUMAN significa calidad y asistencia técnica en más de 160 países.



ORIGEN ALEMANIA
LA MEJOR RELACION COSTO/BENEFICIO

BG Analizadores

BG ANALIZADORES S.A.
Aráoz 86 | C1414DPB | C. A. B. A. | Argentina
Tel: 54-11 4856-2024/5734/2876
Fax: 54-11 4856-5852
www.bganalizadores.com.ar
bga@bganalizadores.com.ar

Interferencias

Numerosos estudios realizados han demostrado que la reacción antígeno-anticuerpo en fase líquida es diferente a las reacciones que ocurren en un gel de agarosa. Puede suceder que algunos antisueros den lugar a reacciones cruzadas con algunos CM por la característica de los mismos.

Considerando los principios analíticos de los métodos actuales (principios de la electroforesis de zona, resolución y sensibilidad), existe la posibilidad remota, de no detectar algún componente que se encuentre en muy baja concentración, en cuyo caso, se recurre a la IF en agarosa.

Comentario

Nuestro laboratorio realizó durante 2009 un trabajo comparativo de IF y de IT, se

estudiaron 110 muestras en forma simultánea por ambos métodos, cuyas conclusiones se presentaron en el XIX Congreso Argentino de Hematología realizado en Mar del Plata del 11 al 14 de Noviembre de 2009.

Como todo método que requiere interpretación, la misma debe estar a cargo de un profesional capacitado.

Bibliografía

1. Gay-Belilie C, Bengoufa D, et. Al.- Automated multicapillary electrophoresis for analysis of human serum proteins. Clin. Chem. 2003; 49: 1909-1915.
2. Henskens Y, et al. Detection and identification of monoclonal gammopathies by capillary electrophoresis. Clin. Chem. 1998; 44: 1184-1190.
3. Katzman JA. et al. Identification of monoclonal proteins in serum: A quantitative comparison of acetate, agarose

gel, and capillary electrophoresis. Electrophoresis 1997; 18: 1775-1780.

4. Bossuyt X and Mariën G. Detection of monoclonal proteins by capillary electrophoresis: Comparison of 2 multichannel automates systems. Clin. Chem.- 2007; 53: 152-153.

5. Bossuyt X. Advances in serum protein electrophoresis. Adv. Clin. Chem. 2006; 42: 43-80.

6. Vermeersch P, Mariën G, and Bossuyt X. Pseudoparaproteinemia related to lomeprol administration after angiocardiology: Detection in the beta fraction by capillary zone electrophoresis.

7. Bossuyt X. Interferences in clinical capillary electrophoresis of serum proteins.- Electrophoresis. 2004; 25: 1485-7.



FORMAMOS UNA LIGA CON PODERES SOBRENATURALES PARA MEJORAR EL MUNDO Y COMBATIR EL CAOS



LA EMPERATRIZ DE LA LIGA, "SUPER BIO-ARS", ANUNCIA QUE TODOS LOS SUPERHÉROES ESTÁN A SUS ÓRDENES, SOLICÍTELOS EN WWW.BIOARS.COM.AR

No se pierda el próximo capítulo...
Liga del Diagnóstico

