



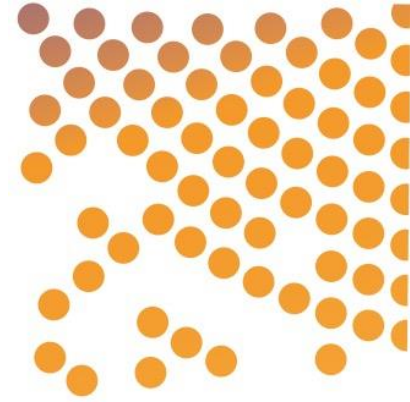
Electroforesis de proteínas séricas: reconocimiento y manejo de interferencias

Nieves SANZ

Asesora Científica

nsanz@sebia.com

Programa

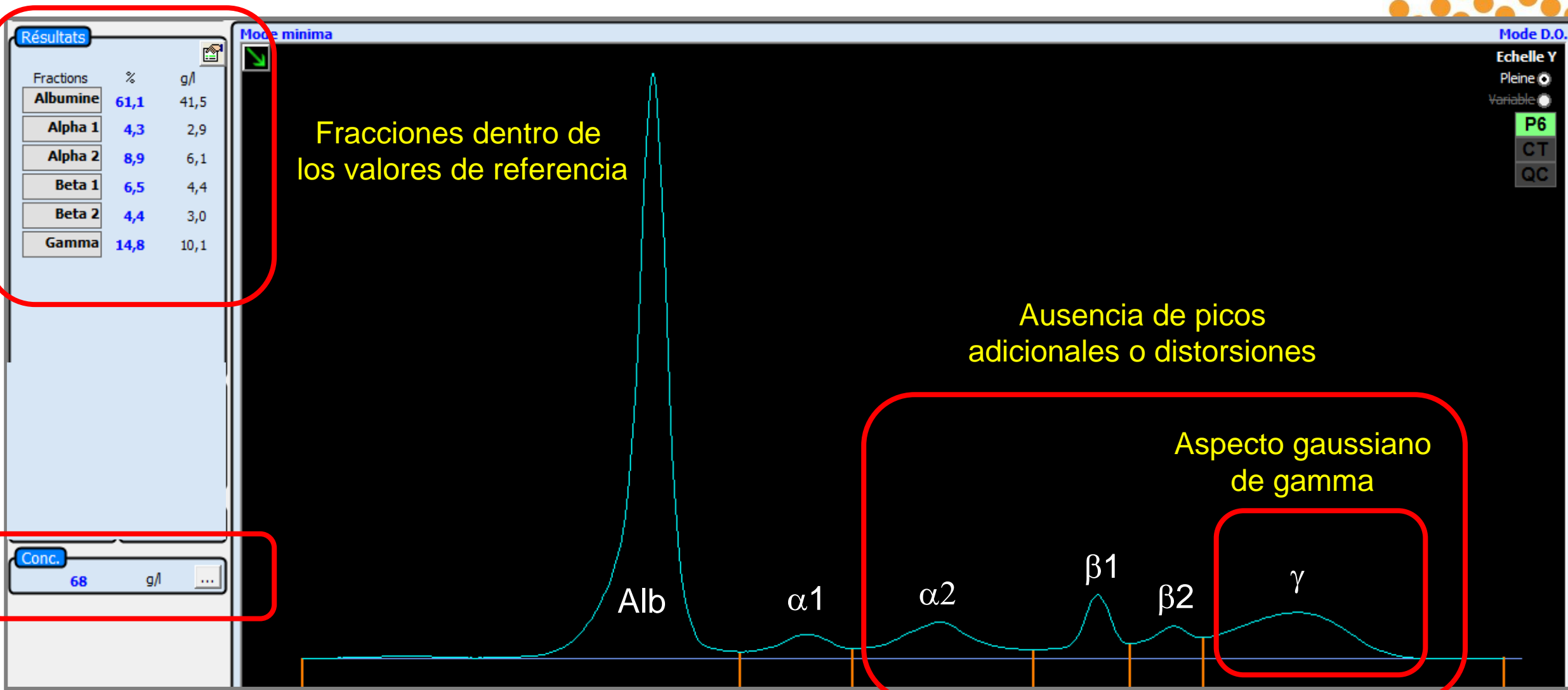
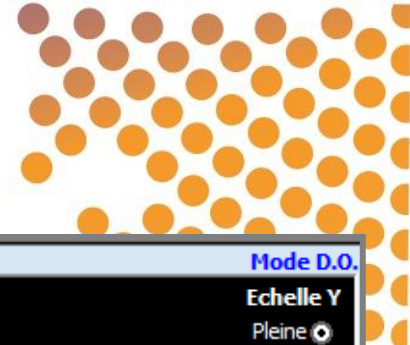


1. ¿Cuándo sospechar la presencia de una inmunoglobulina monoclonal?
2. Herramientas de Phoresis para facilitar la interpretación de resultados
3. Reconocimiento y manejo de interferencias endógenas y exógenas

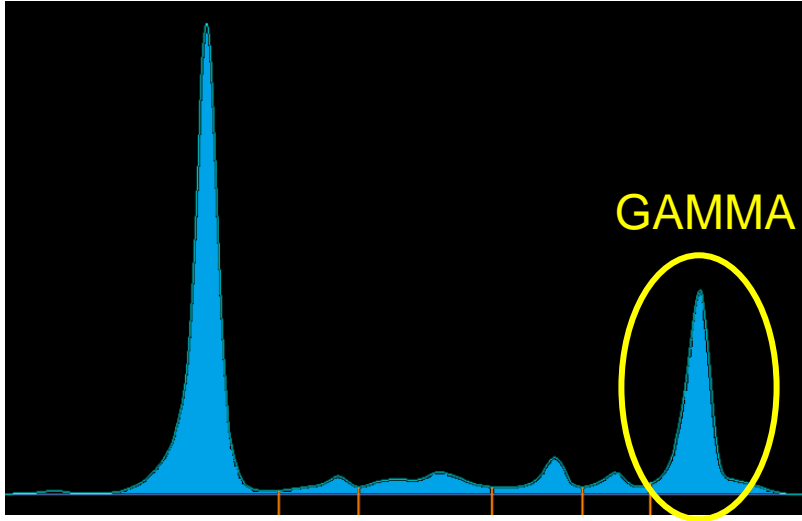
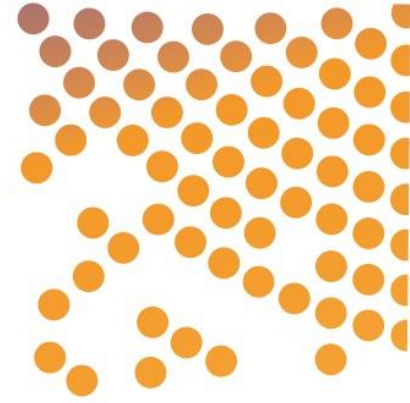


¿Cuándo sospechar la presencia de una inmunoglobulina monoclonal?

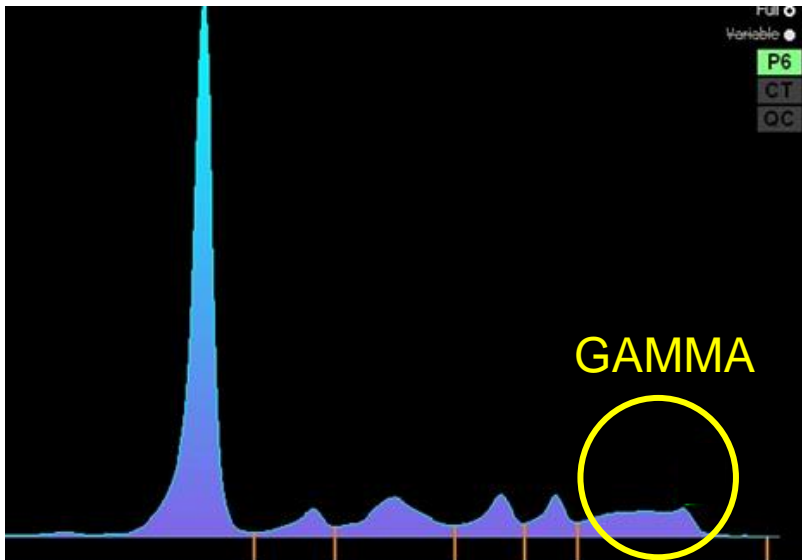
Perfil normal



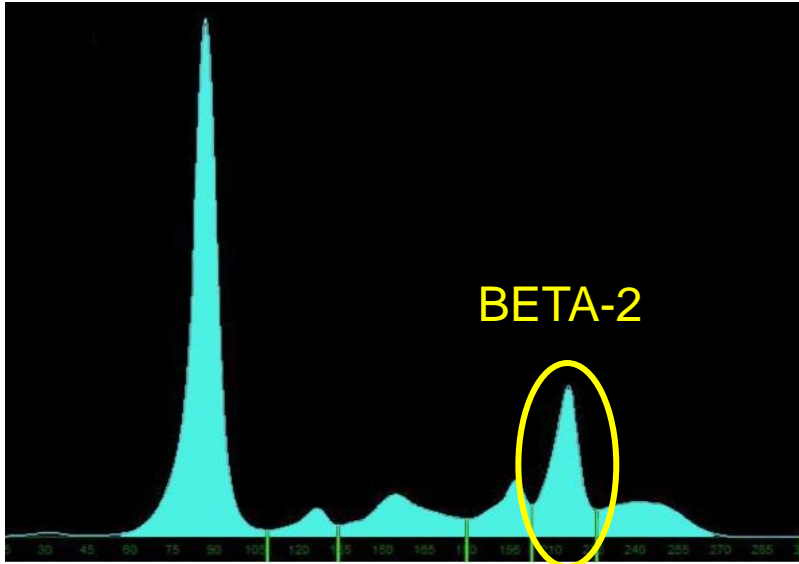
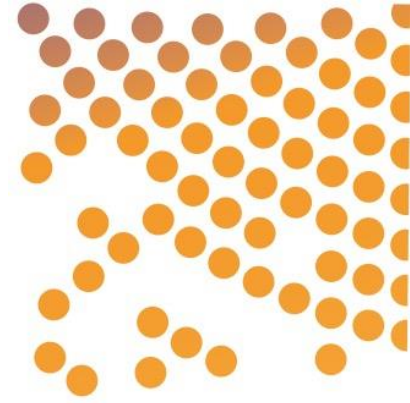
¿ Cuándo sospechar la presencia de una inmunoglobulina monoclonal ?



Pico, distorsión o deformación en fracción gamma

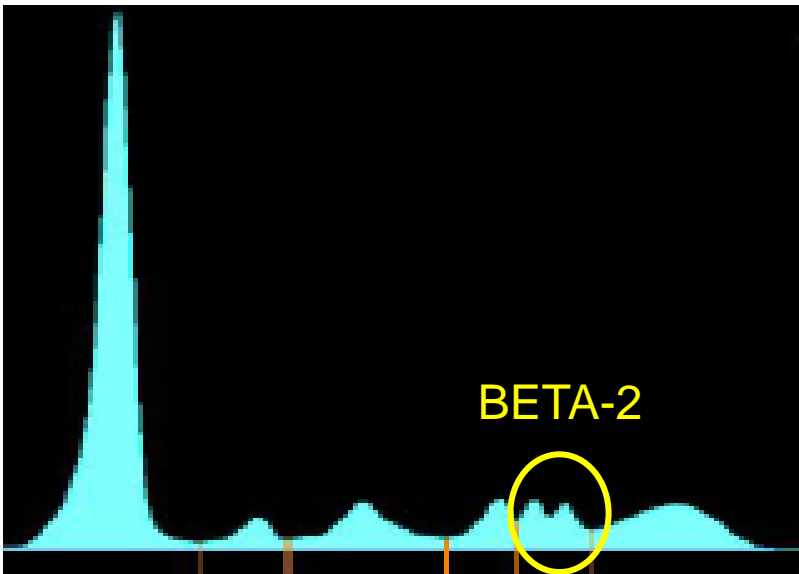


¿ Cuándo sospechar la presencia de una inmunoglobulina monoclonal ?



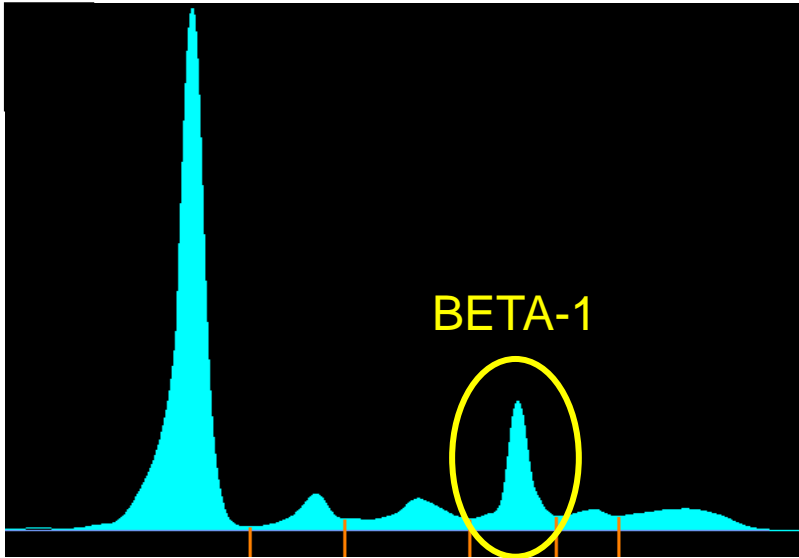
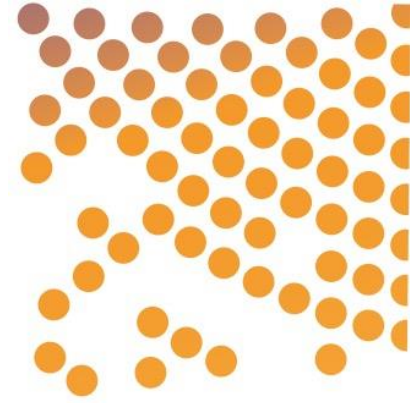
beta-2 > beta-1

(fuera de contexto inflamatorio o daño hepático)



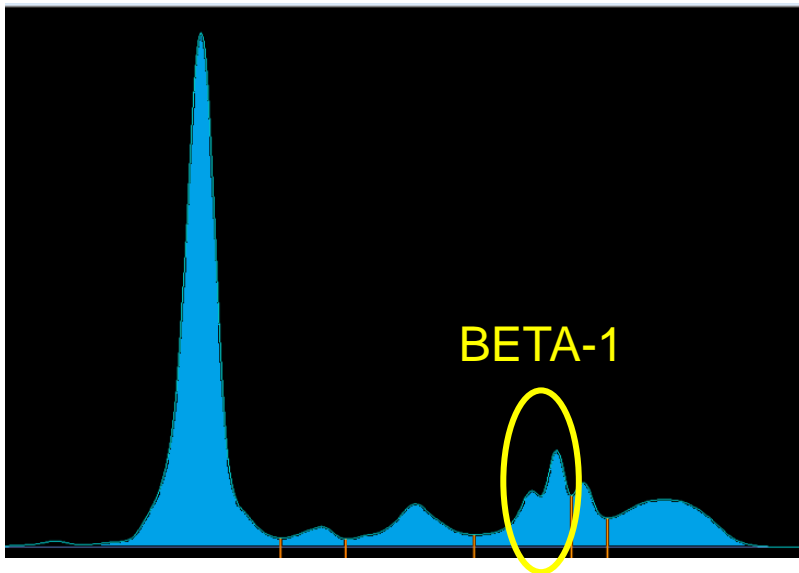
Pico adicional o deformación en beta-2

¿ Cuándo sospechar la presencia de una inmunoglobulina monoclonal ?



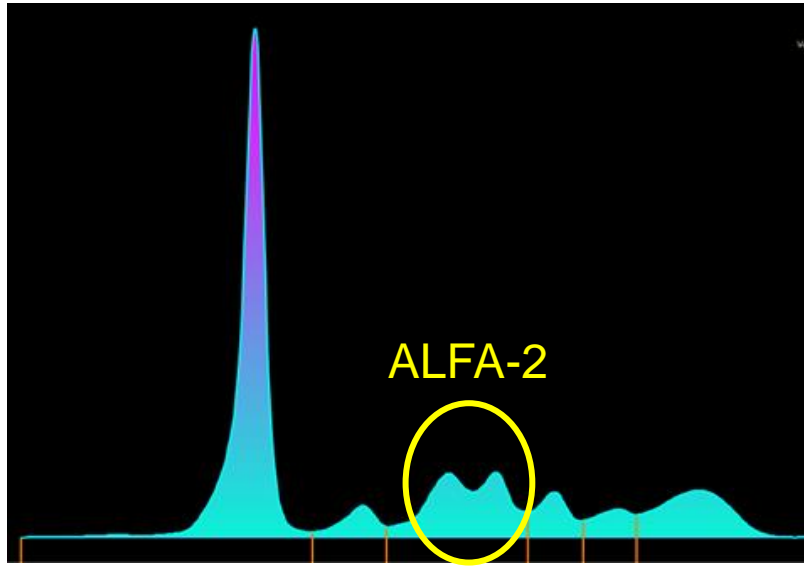
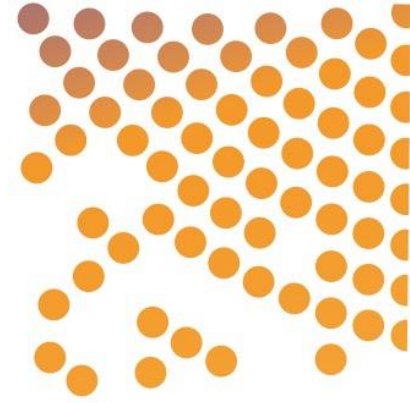
Aumento aislado de beta-1

(fuera de contexto de hemólisis o anemia ferropénica)

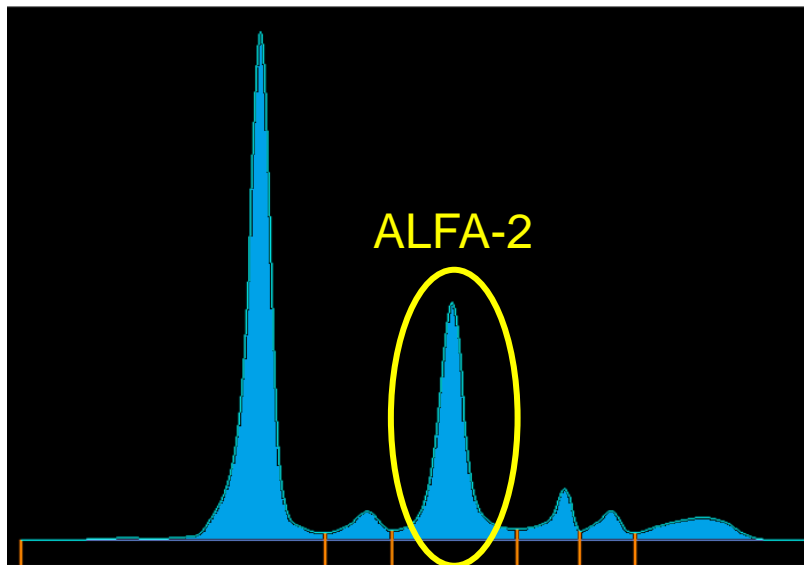


Pico adicional o deformación en beta-1

¿ Cuándo sospechar la presencia de una inmunoglobulina monoclonal ?



Pico adicional o deformación en alfa-2



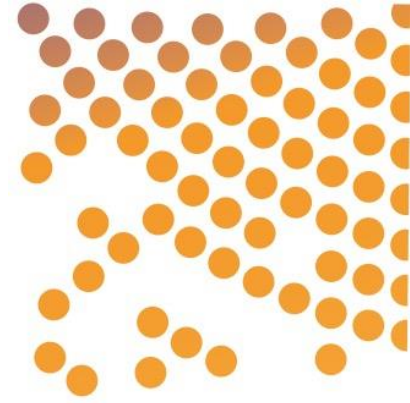
Aumento aislado de alfa-2

(fuera de contexto inflamatorio o síndrome nefrótico)



Herramientas de Phoresis

Software Phoresis



- Petición IT
- Alisado 0
- Curva de Referencia
- Optimización de la curva
- Cuantificación del pico
- Migración lenta

PETICIÓN IT

Fraction values

Names	%	g/l
Albumin	51,2 <	41,0
Alpha 1	2,5 <	2,0 <
Alpha 2	6,1 <	4,9 <
Beta 1	32,7 >	26,2 >
Beta 2	2,2 <	1,8 <
Gamma	5,3 <	4,2 <

Concentración total de Ig

- < 8 g/L = Hipogamma
- 8 – 20 g/L = Estándar
- > 20 g/L = Hipergamma

Dilución

Seleccionar una dilución



Hipogamma

Estándar

Hipergamma

Optimizada

OK Anular

Datos del paciente

Pico

N/N

Auto

Patológica

Ficha Detallada

Ficha Visualizar

Petición IT

Estándar

Optimizar

Redibujar

Alisado 0



Imunofijación o
Immunotyping



- Perfil oligoclonal
- Ig polimerizada

Curva de referencia

Valores Fracciones

Nombres	%
Albumine	64,8
Alpha 1	3,7
Alpha 2	7,9
Beta 1	5,9
Beta 2	4,6
Gamma	13,1

Gestión Mínimos

Representación en DO

Escala Y
Completa
Variable

P6
a CT
QC

Datos del paciente

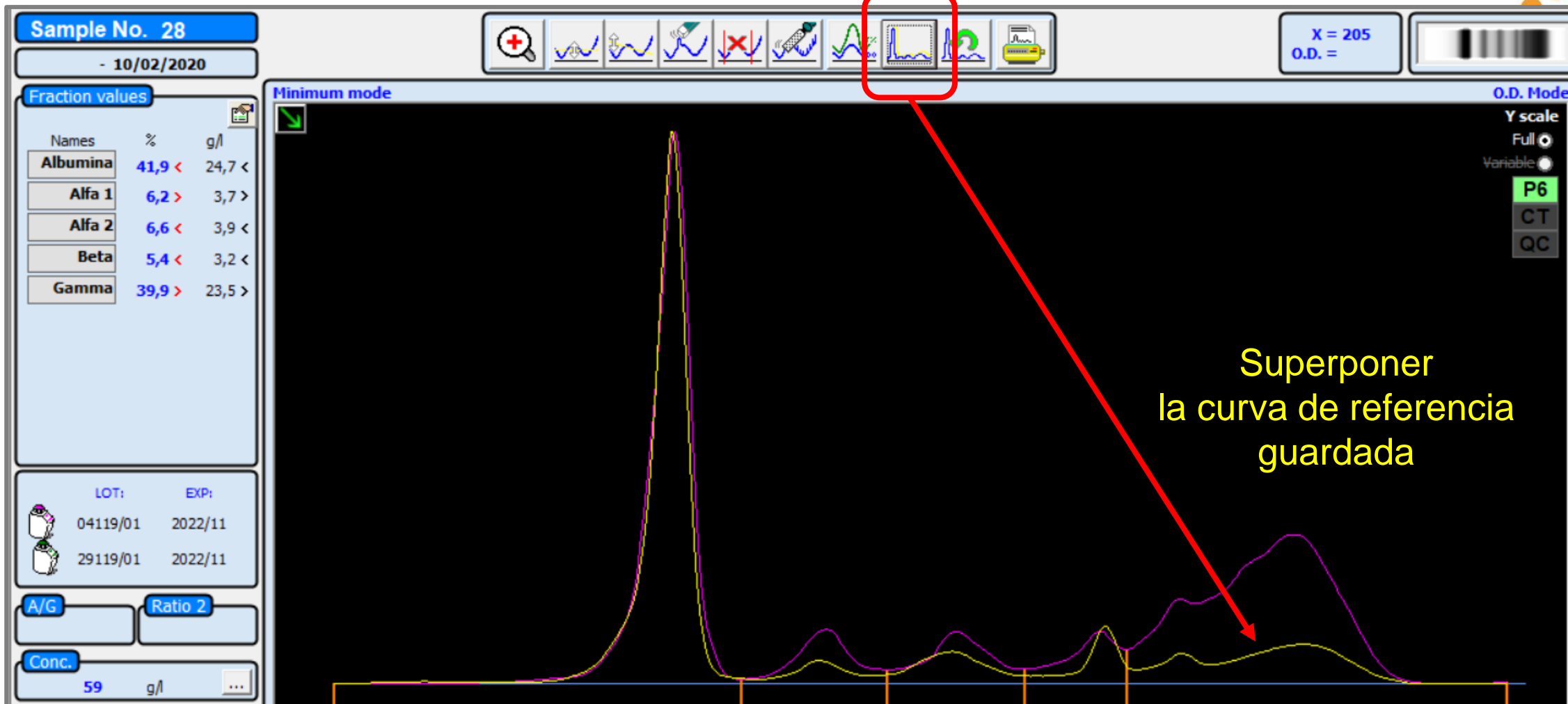
Edad:
Sección:
ID : NORMAL CTL-2

Guardar una curva de control Normal como curva de referencia

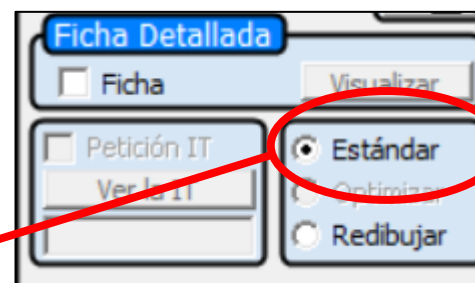
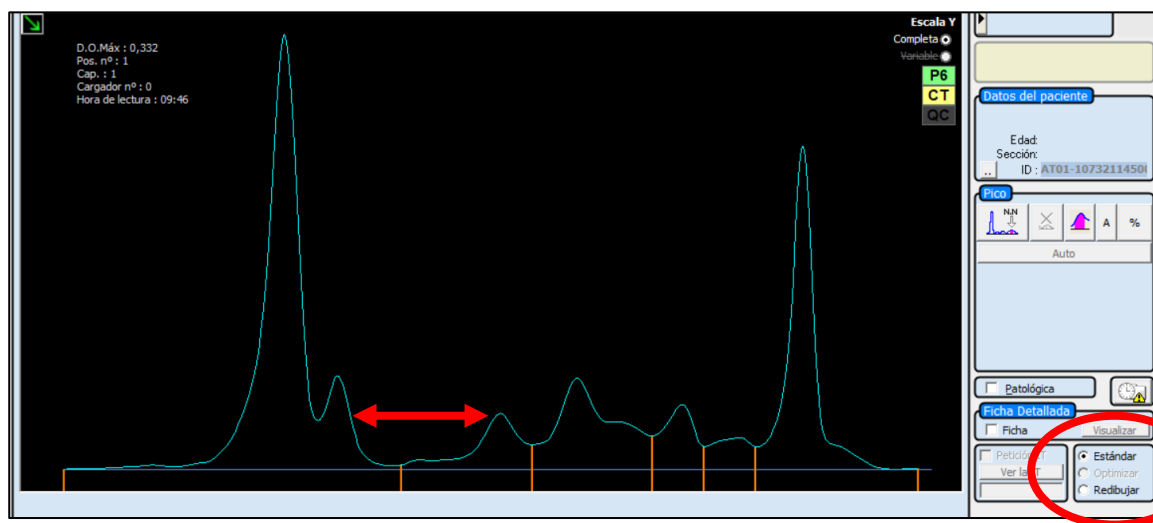
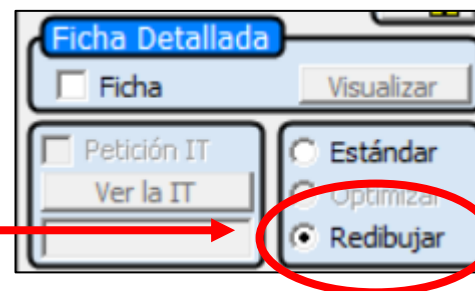
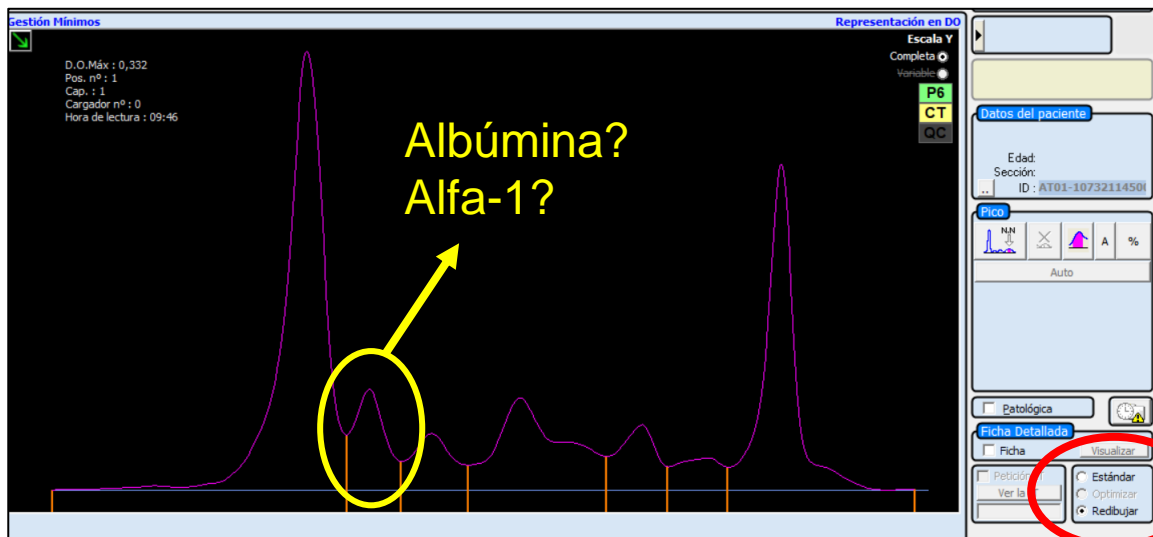
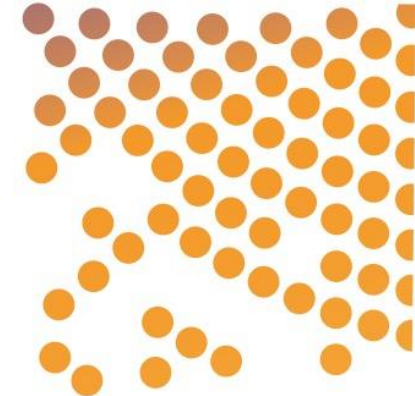
0 1 2 3 4 5

sebia

Curva de referencia

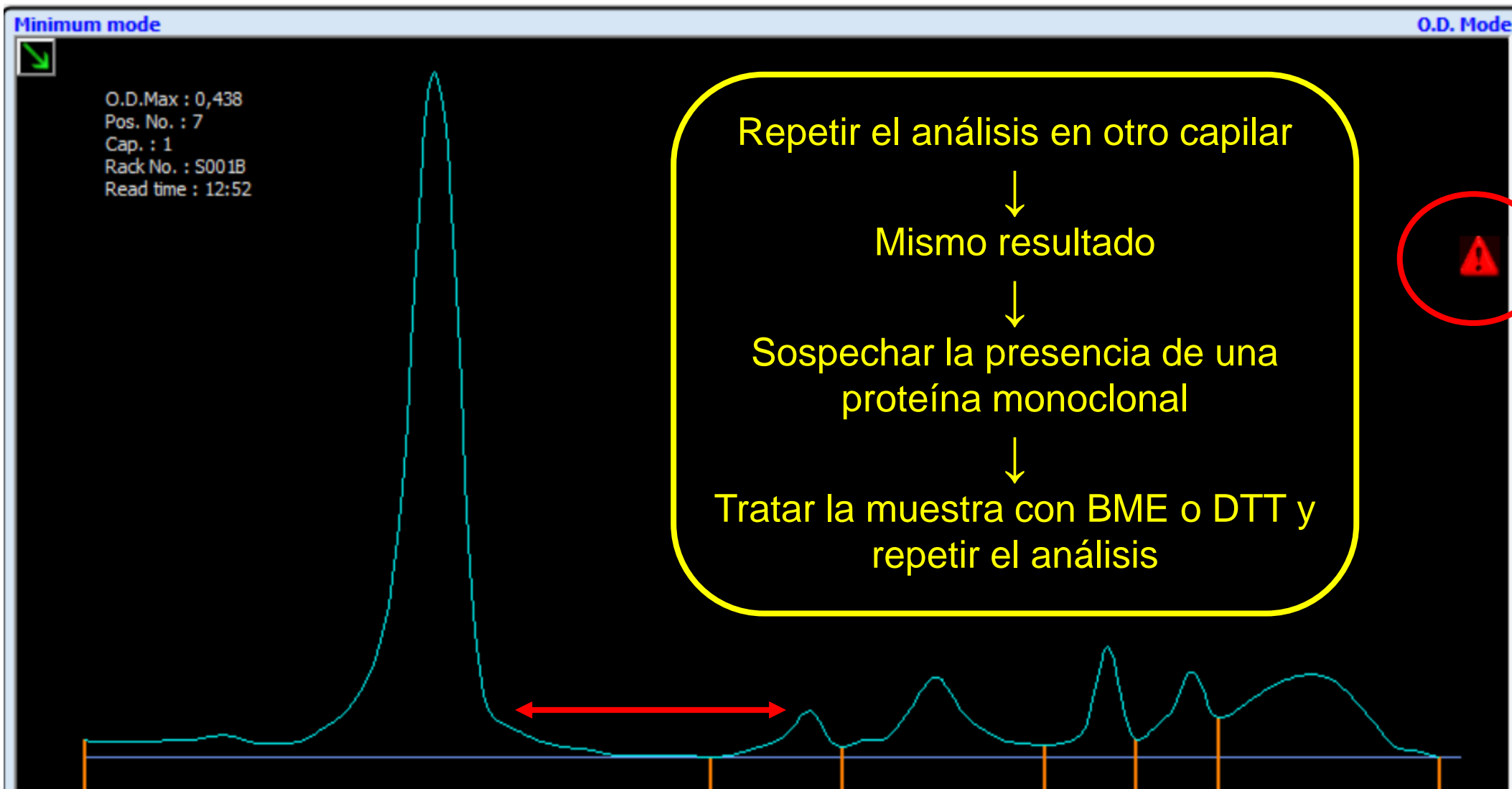


Optimización de la curva

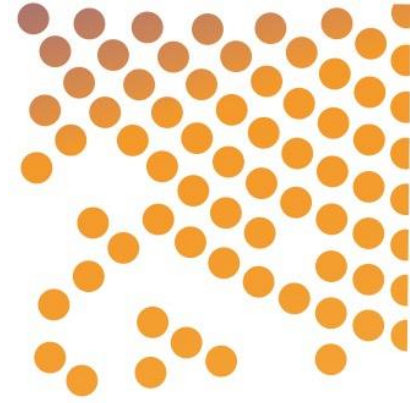


Cambiar a

Migración fuera de rango



Tratamiento con BME



- 1) Preparar una solución de BME al 1%:
 - a) 10 μ L BME + 90 μ L H₂O
 - b) 10 μ L BME (1/10) + 90 μ L Fluidil (Sebia, Ref 4587) o solución fisiológica

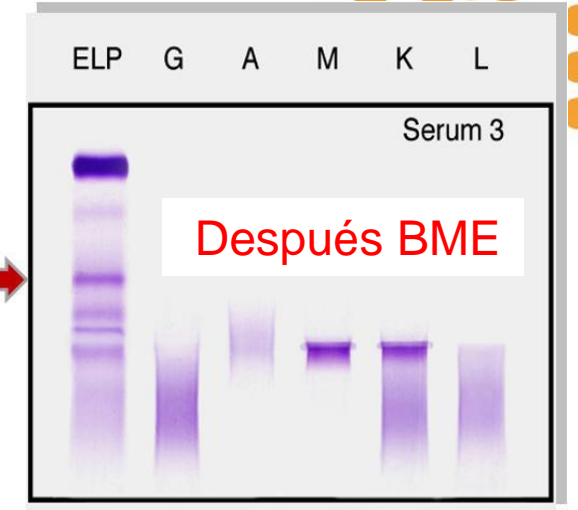
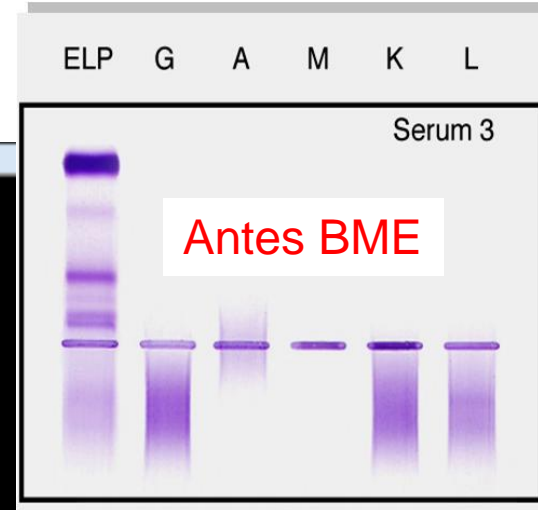
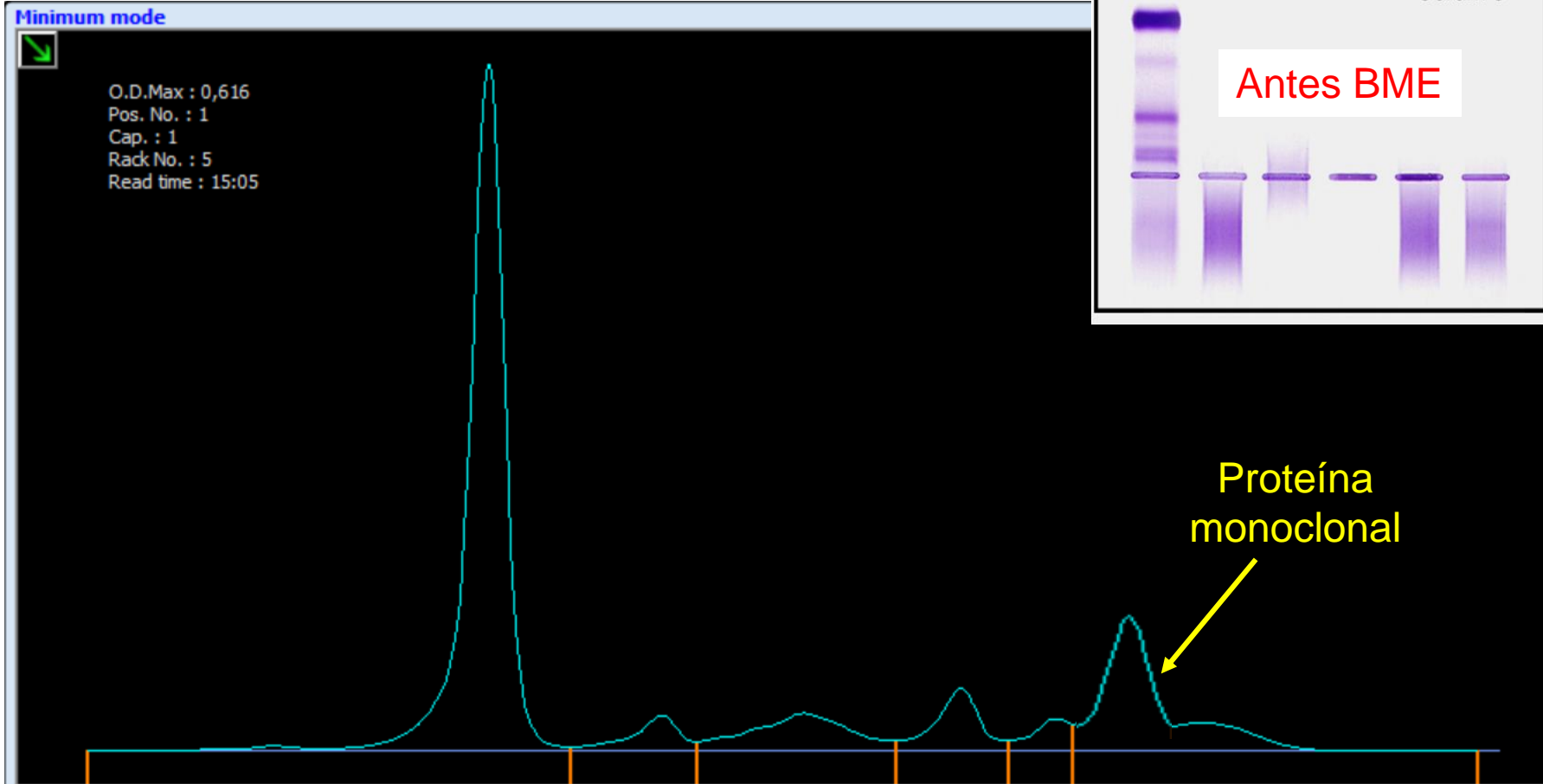
- 2) Mezclar 25 μ L de solución de BME al 1% + 75 μ L suero

- 3) Incubar 10 minutos a temperatura ambiente

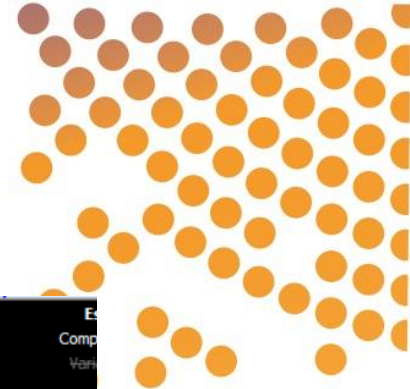
- 4) Analizar la muestra tratada rápidamente

Migración fuera de rango

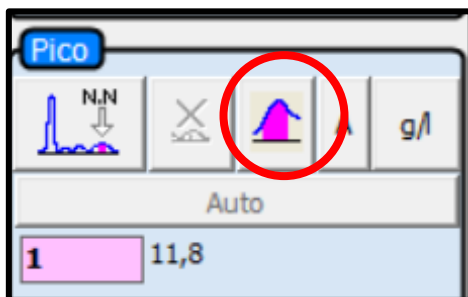
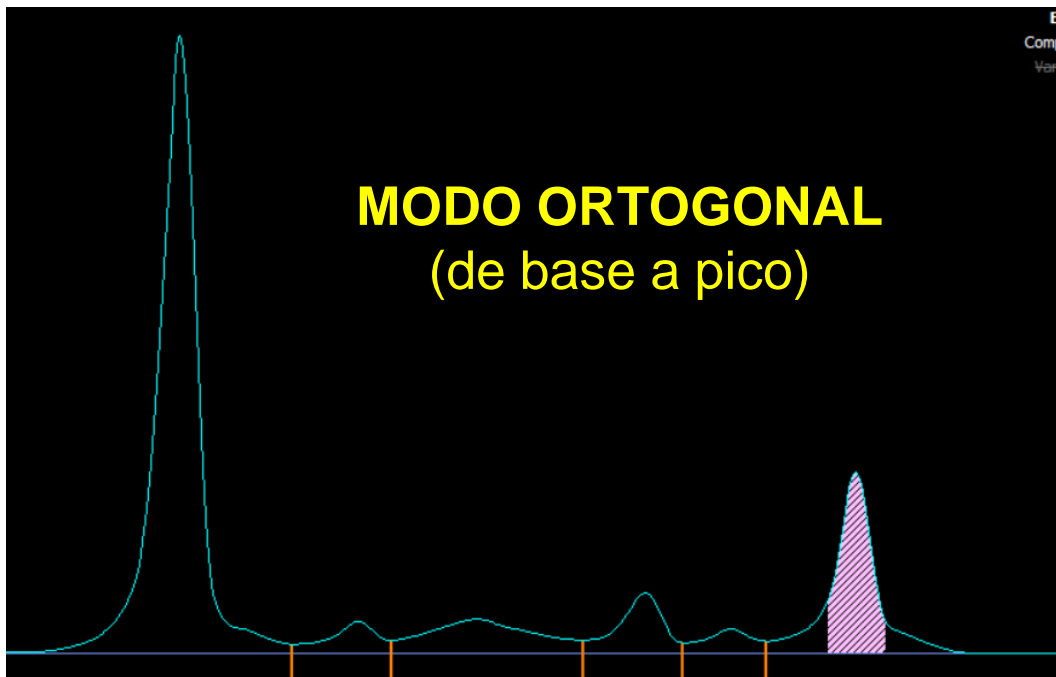
Muestra luego del tratamiento con BME:



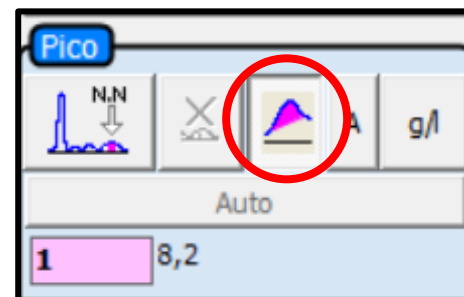
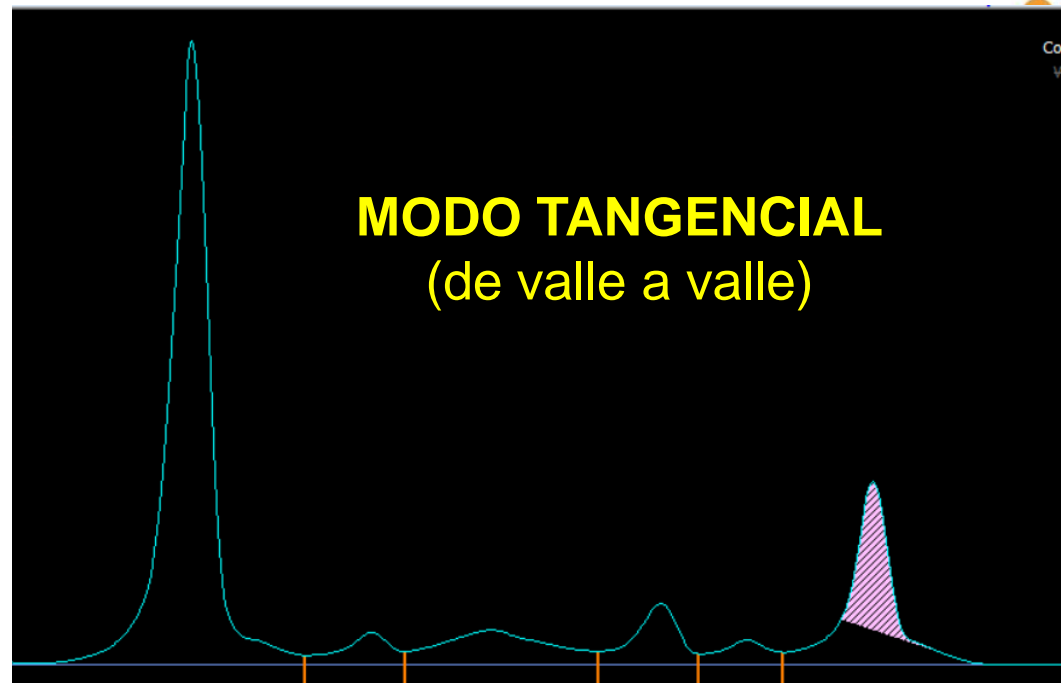
Cuantificación del pico monoclonal



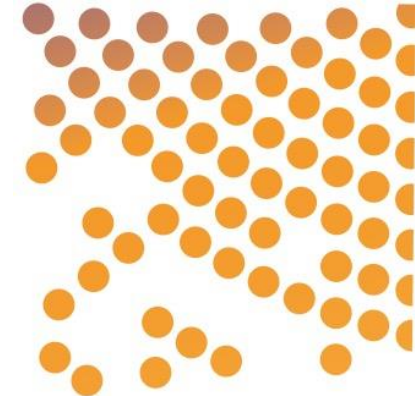
MODO ORTOGONAL
(de base a pico)



MODO TANGENCIAL
(de valle a valle)



Cuantificación del pico monoclonal



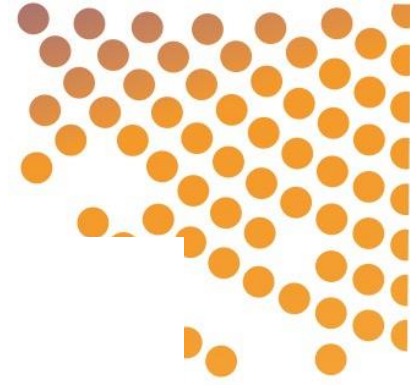
La cuantificación del pico es necesaria para:

- La clasificación de la anomalía
- Controlar la progresión del pico monoclonal de un estado no maligno a un estado maligno
- Evaluar la respuesta al tratamiento

	MGUS	Smoldering Myeloma	Multiple Myeloma
M-protein serum concentration	< 30 g/l	> 30 g/l*	No cut-off value

RESULTADO DEL TRATAMIENTO	DEFINICIÓN
Remisión o respuesta completa (RC)	Niveles de paraproteína en sangre no detectables y porcentaje de células plasmáticas en la médula dentro de niveles normales, o ausencia de células mielomatosas en la médula ósea.
Respuesta parcial muy buena	Descenso de más del 90% en niveles de paraproteína desde el inicio del tratamiento
Remisión parcial (RP)	Descenso de más del 50% en niveles de paraproteína desde el inicio del tratamiento
Respuesta mínima	Descenso de más del 25% pero menos del 50% en niveles de paraproteína desde el inicio del tratamiento
Enfermedad estable	Descenso de menos del 25% en niveles de paraproteína desde el inicio del tratamiento
Enfermedad en progresión	Incremento de más del 25% en niveles de paraproteína desde el inicio del tratamiento o detección de nuevas anomalías óseas

Cuantificación del pico monoclonal



Recomendaciones:

- El pico monoclonal en región gamma debe cuantificarse en g/L o g/dL, redondeando al número entero más cercano.
- Si la concentración del pico monoclonal es <1 g/L, no puede cuantificarse de manera confiable, especialmente si existe fondo policlonal de gammaglobulina; debe reportarse “proteína monoclonal <1 g/L” o “proteína monoclonal discreta”.
- Si la proteína monoclonal se encuentra en región no-gamma, se recomienda reportar la concentración total de la fracción como: “proteína monoclonal + fracción beta-2”, por ejemplo.

Recommendations for standardized reporting of protein electrophoresis in Australia and New Zealand

Jillian Tate¹, Grahame Caldwell², James Daly³, David Gillis⁴, Margaret Jenkins⁵, Sue Jovanovich⁶, Helen Martin⁷, Richard Steele⁸, Louise Wienholt⁹ and Peter Mollee¹⁰
on behalf of the Working Party on Standardised Reporting of Protein Electrophoresis

DE GRUYTER

Clin Chem Lab Med 2016; aop

Review

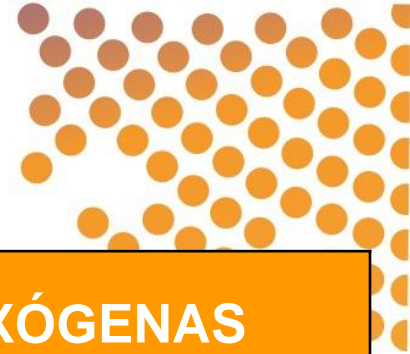
David F. Keren* and Lee Schroeder

Challenges of measuring monoclonal proteins in serum



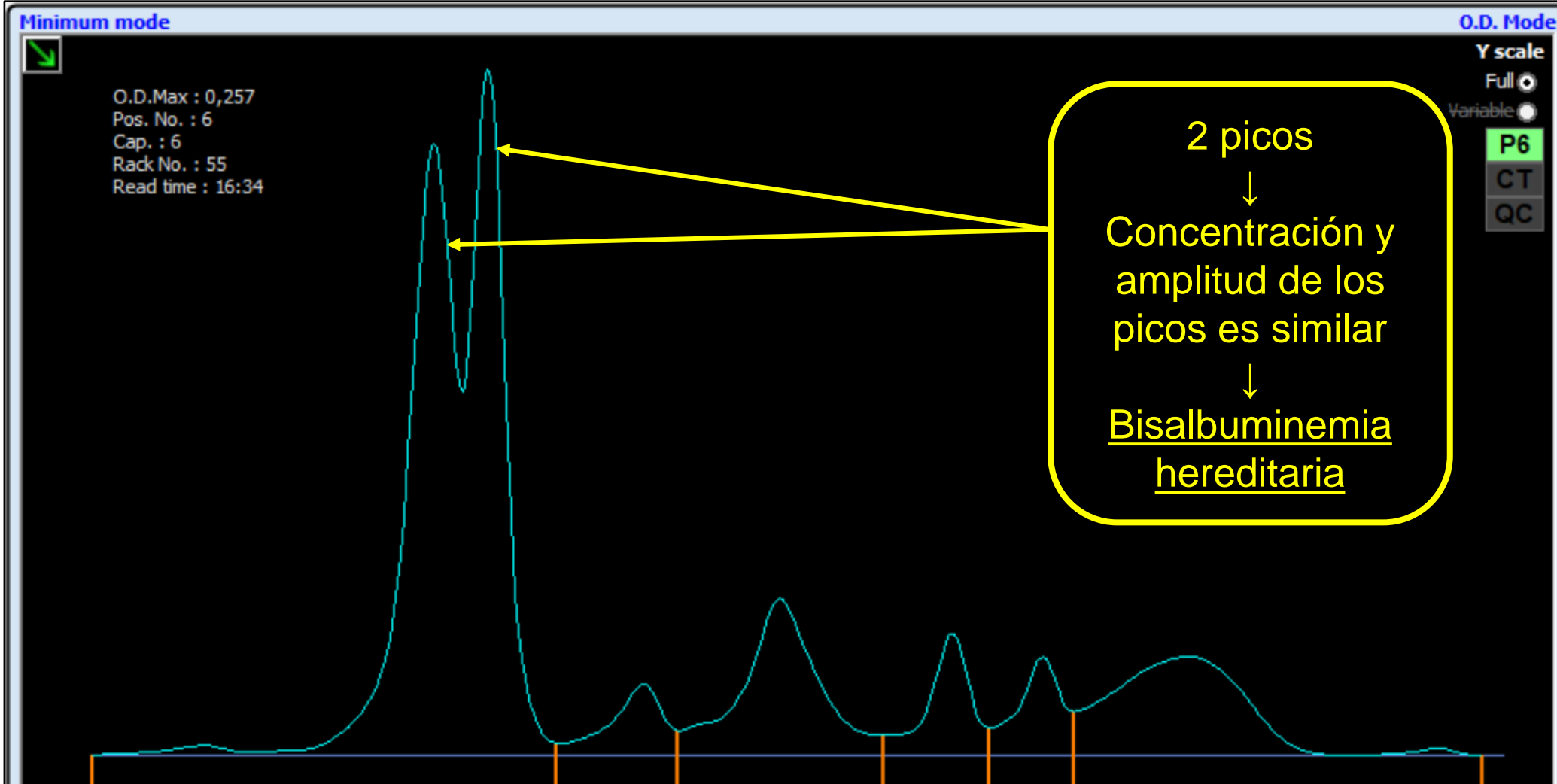
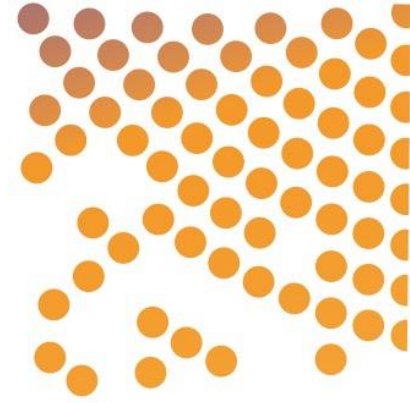
Reconocimiento y manejo de interferencias

Reconocimiento y manejo de interferencias

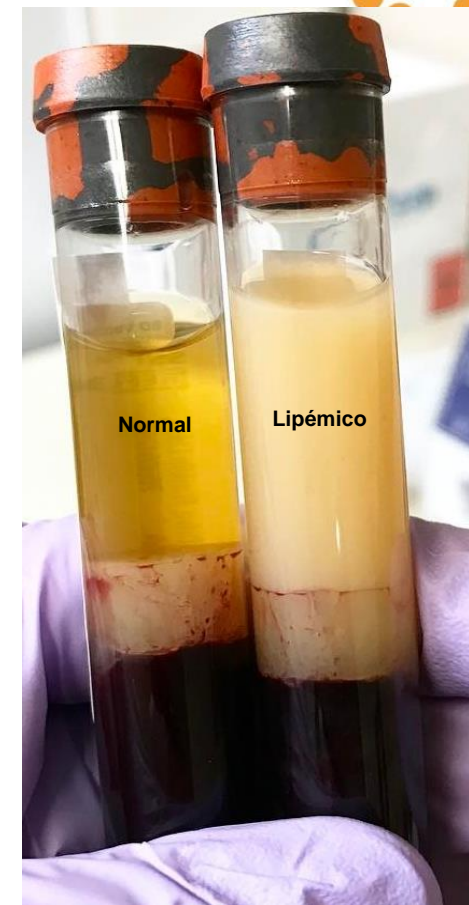
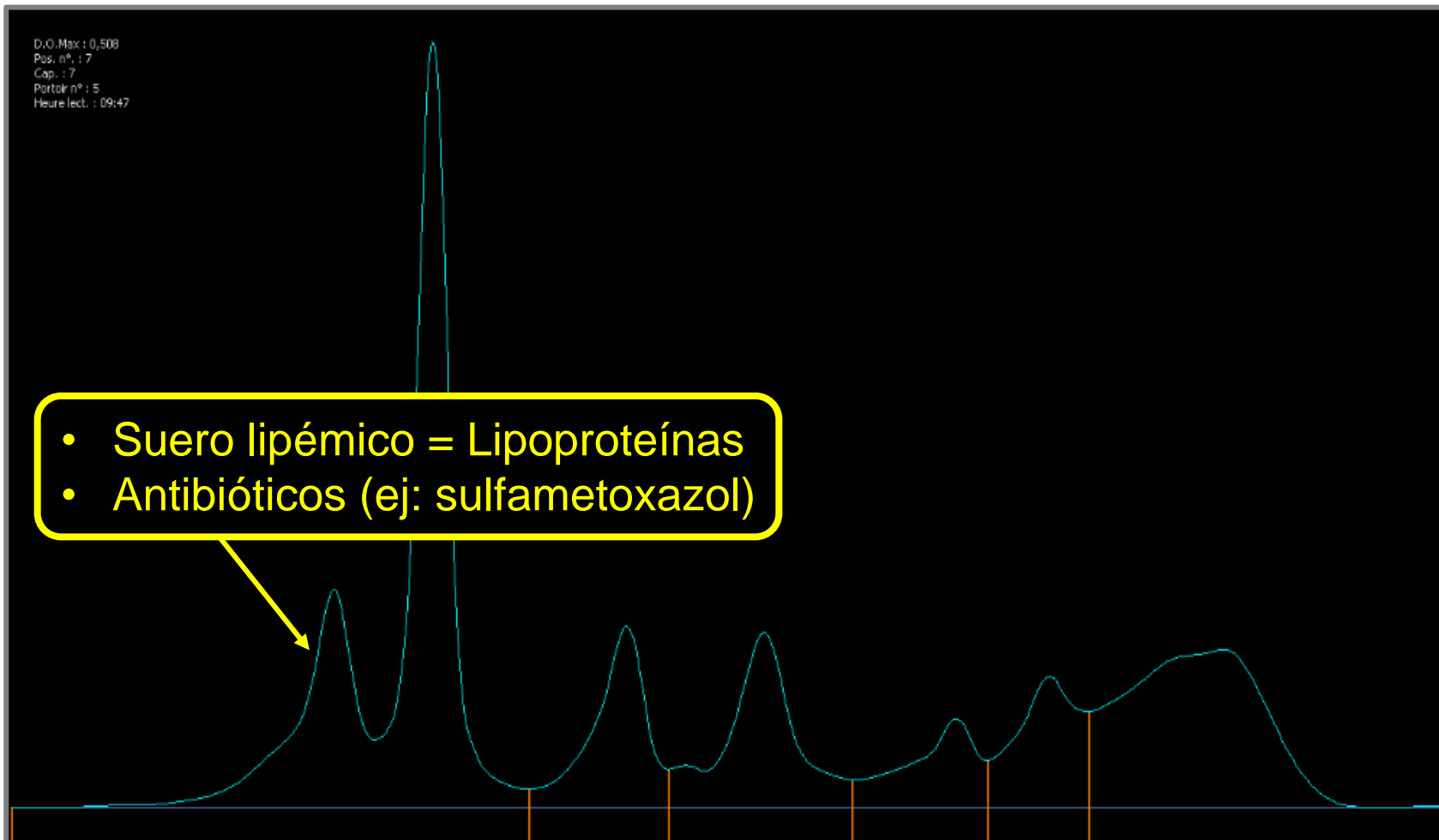


FRACCIÓN	INTERFERENCIAS ENDÓGENAS	INTERFERENCIAS EXÓGENAS
Albúmina	<ul style="list-style-type: none">• Bisalbuminemia• Pigmentos biliares• Lipoproteínas	<ul style="list-style-type: none">• Algunos antibióticos
Alfa-1	<ul style="list-style-type: none">• Fenotipos de alfa-1-antitripsina	
Alfa-2	<ul style="list-style-type: none">• Fenotipos de haptoglobina	<ul style="list-style-type: none">• Hemólisis• Productos de contraste
Beta-1	<ul style="list-style-type: none">• Transferrina	<ul style="list-style-type: none">• Hemólisis
Beta-2	<ul style="list-style-type: none">• Fibrinógeno• Complemento C4	<ul style="list-style-type: none">• Productos de contraste
Gamma	<ul style="list-style-type: none">• CRP• IgG4	<ul style="list-style-type: none">• Algunos antifúngicos• Terapias con anticuerpos monoclonales

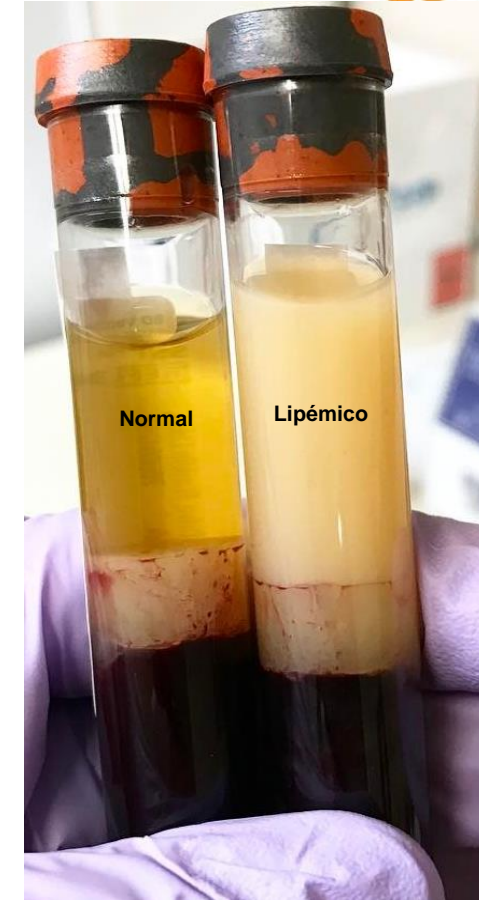
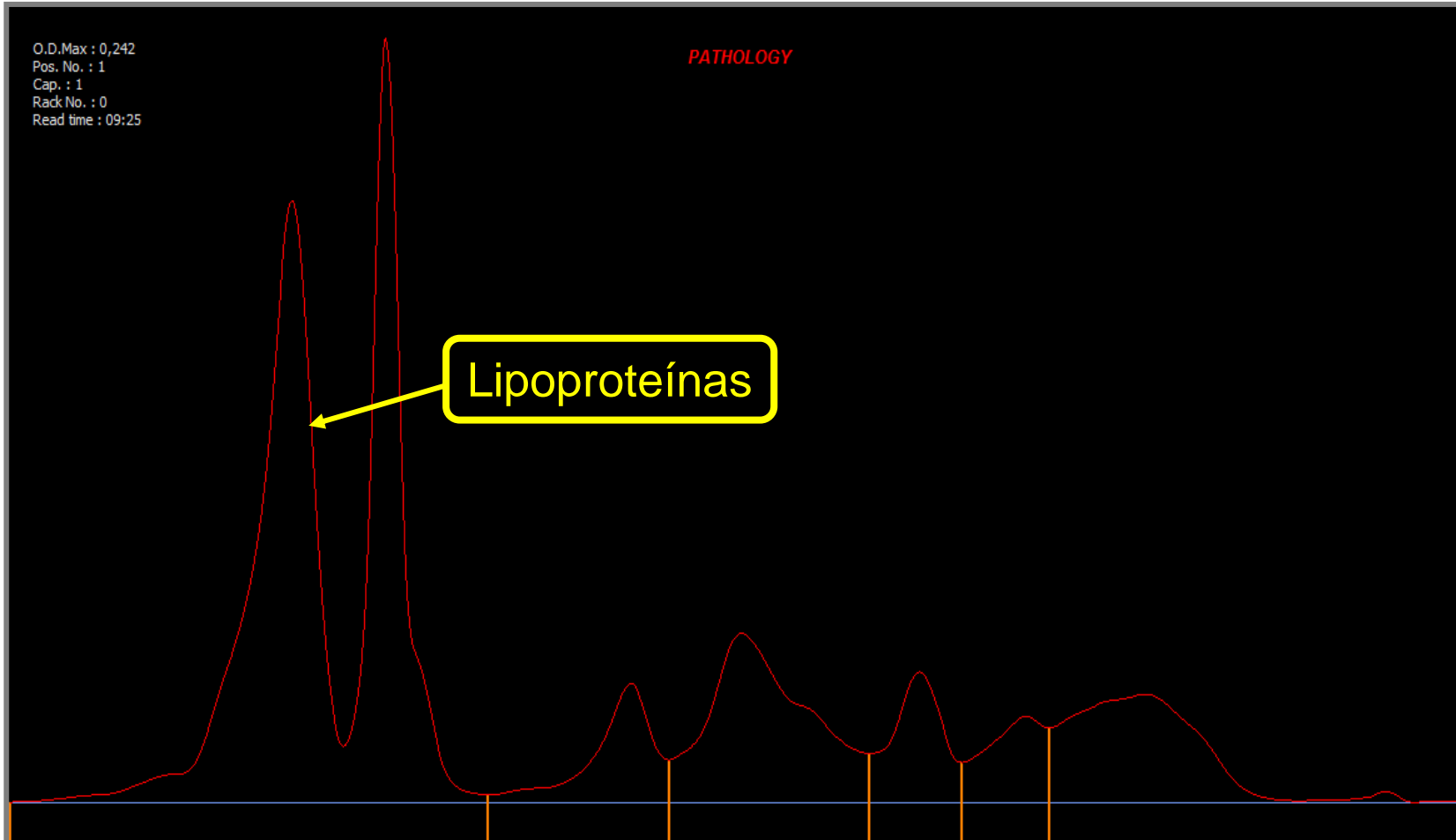
Albúmina



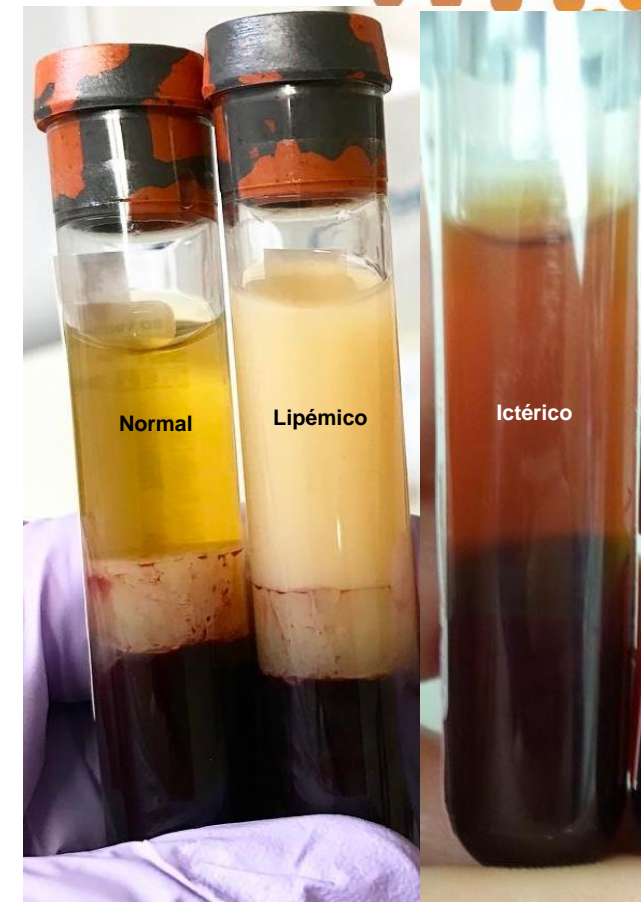
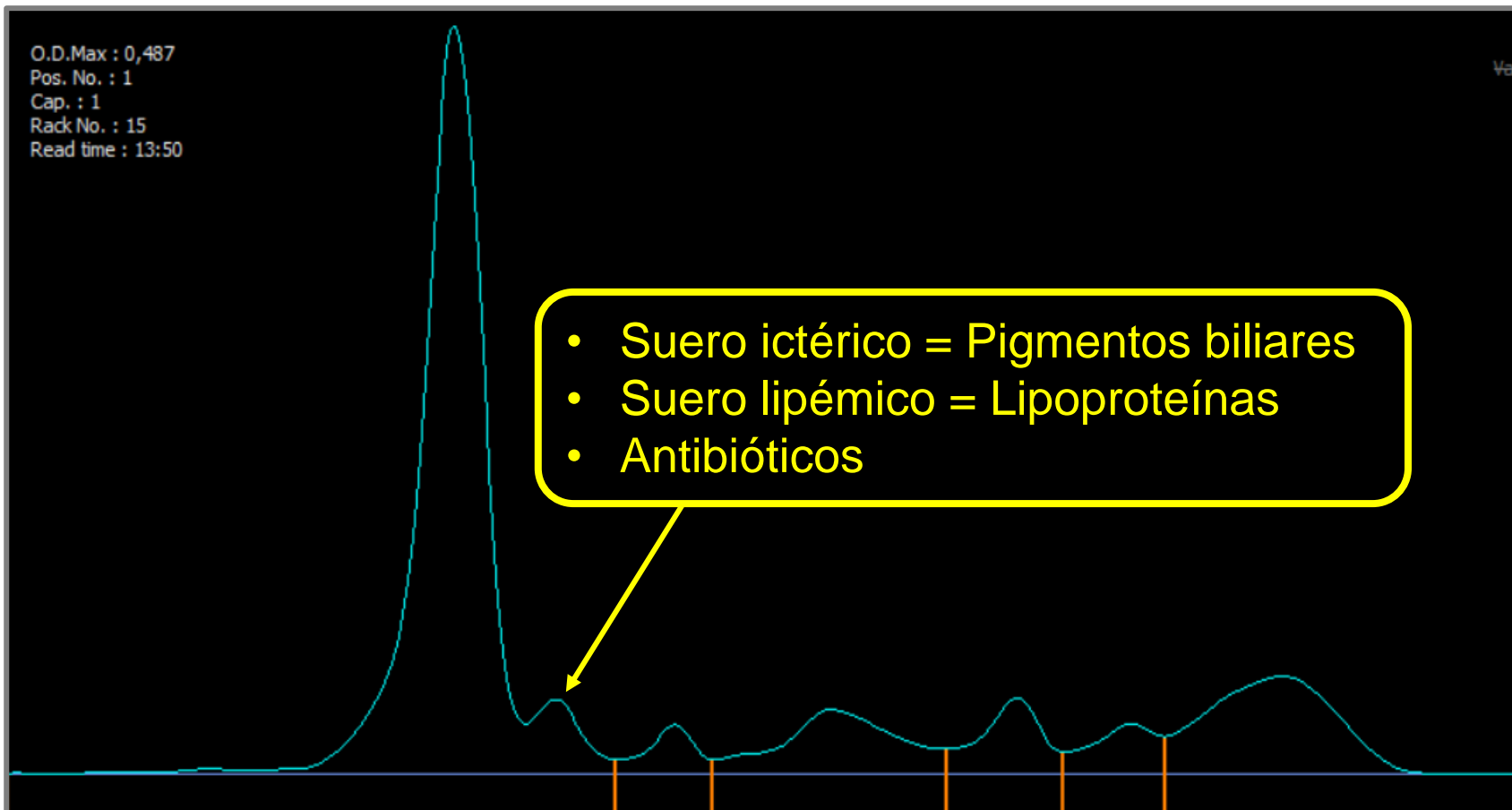
Albúmina



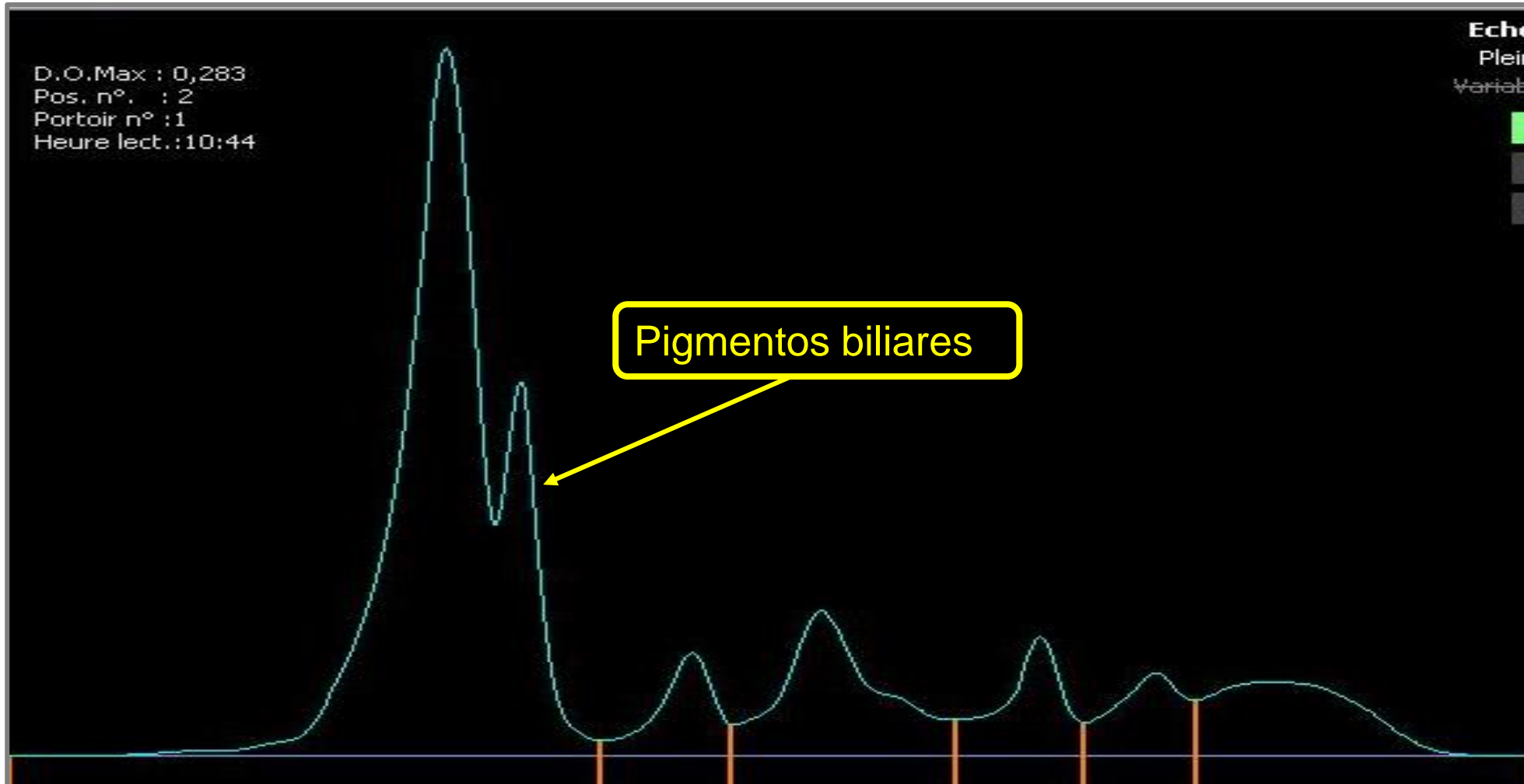
Albúmina



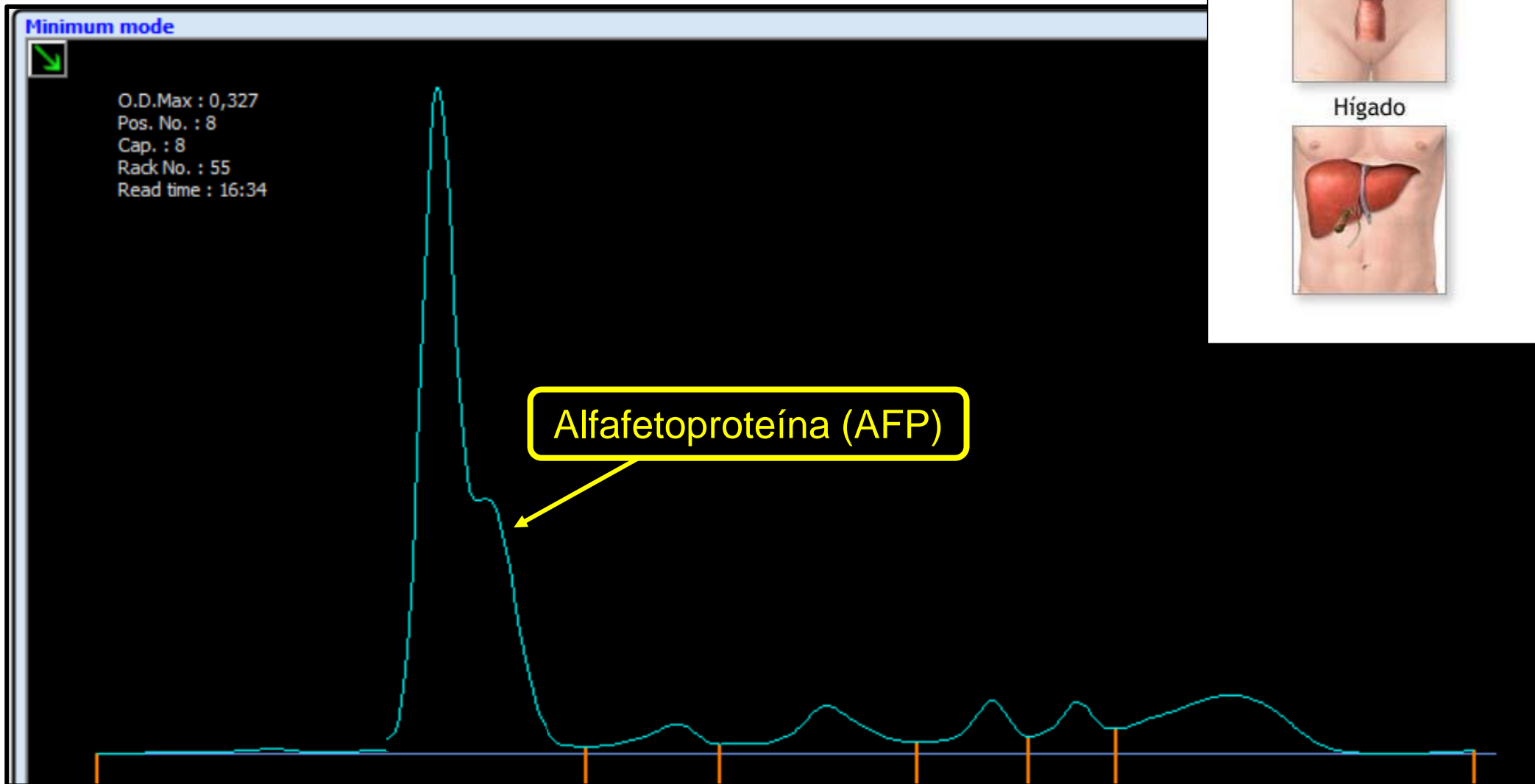
Albúmina



Albúmina



Albúmina



Ovarios



Feto



Hígado

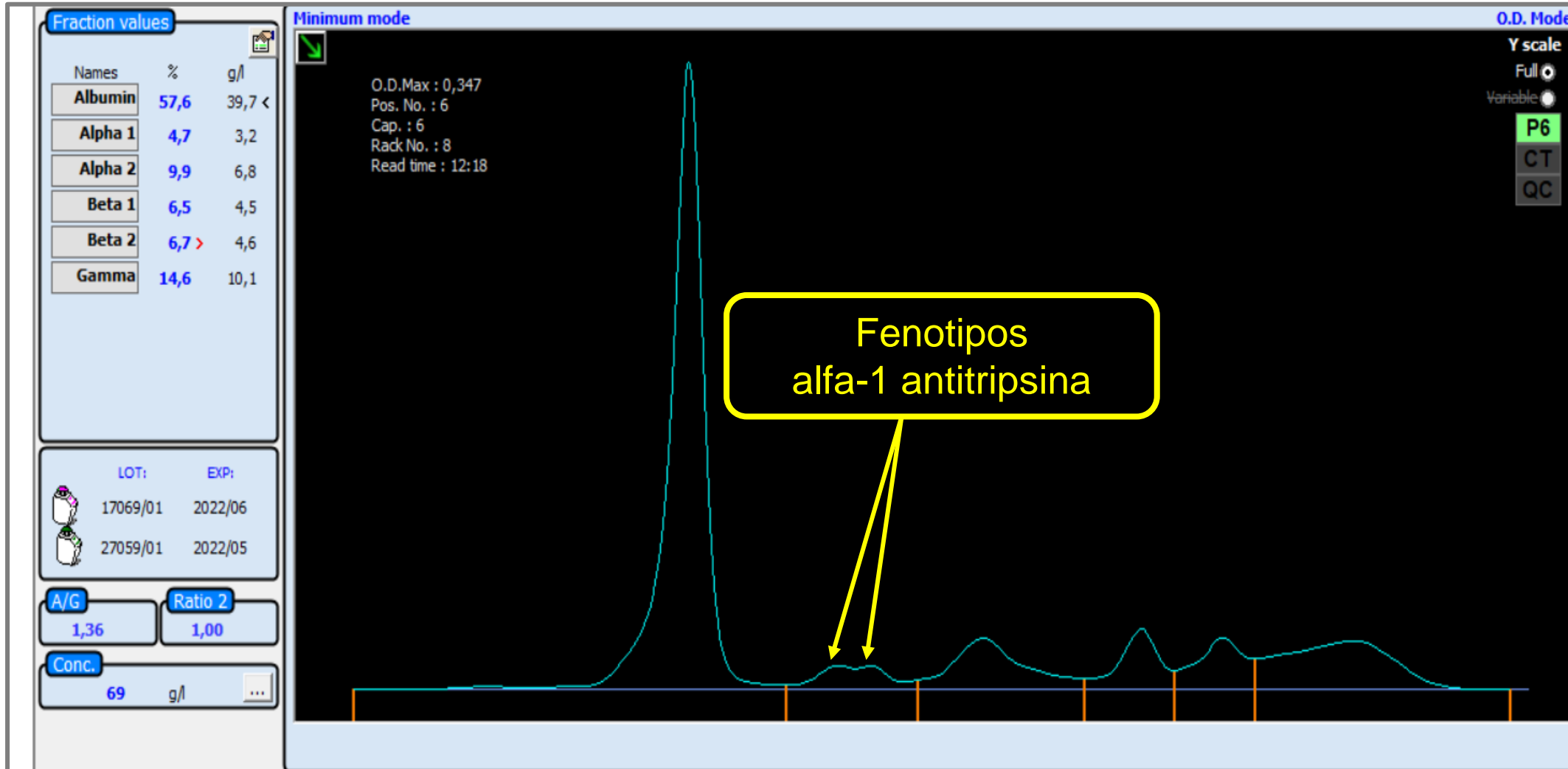
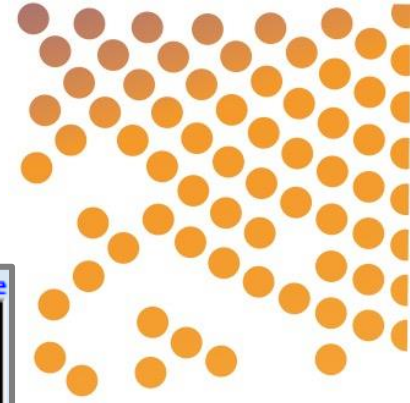


Testículos

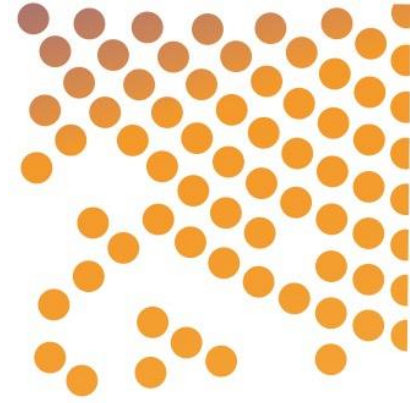


ADAM.

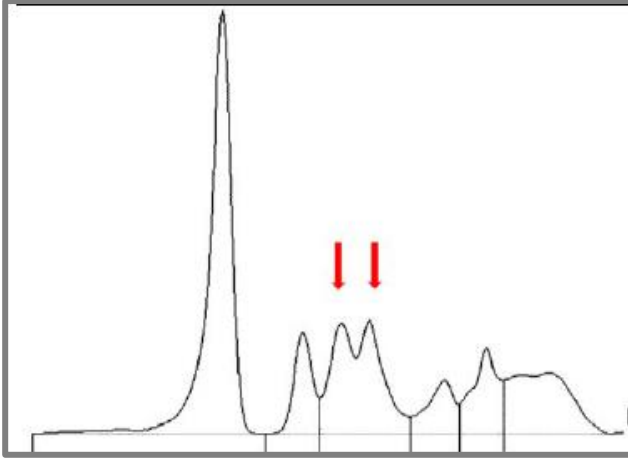
Alfa-1



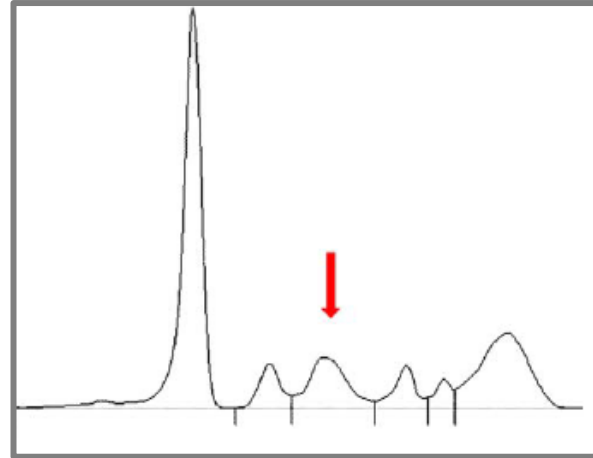
Alfa-2



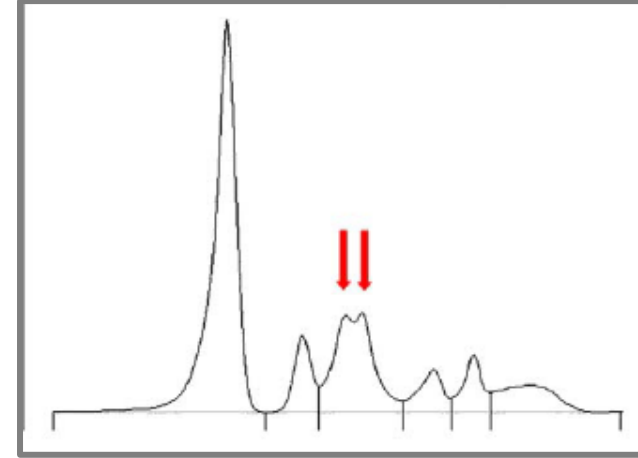
Haptoglobin phenotype 1-1: spaced bands



Haptoglobin phenotype 2-2: one band

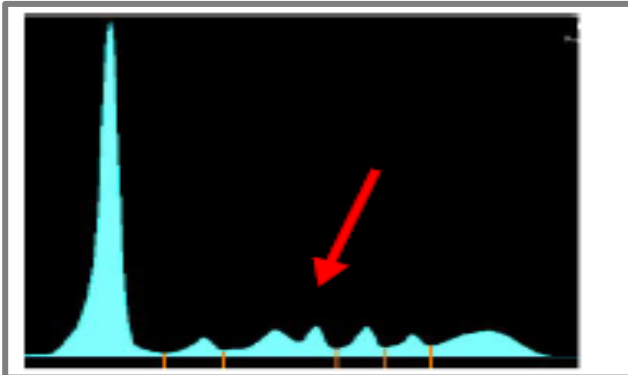


Haptoglobin phenotype 1-2: narrow bands

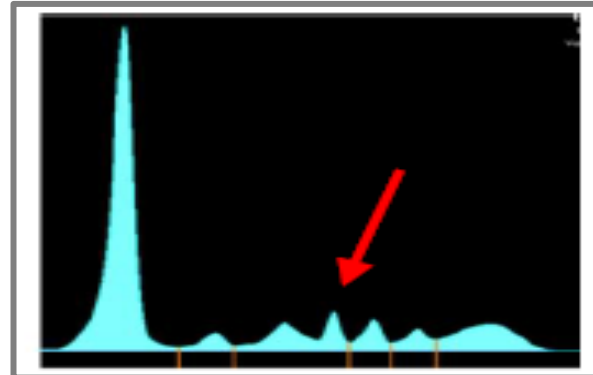


FENOTIPOS DE HAPTOGLOBINA

Omnipaque®
(Iohexol)



Iopamiron®
(Iopamidol)



PRODUCTOS DE CONTRASTE

Productos de contraste

- Los productos de contraste absorben a la misma longitud de onda que las proteínas séricas (200 nm)
- Si el paciente recibió una inyección de producto de contraste en los últimos 2 a 6 días, antes de la extracción de la muestra de sangre, puede observarse un pico adicional, distorsión o aumento de una de las fracciones, simulando la presencia de un componente monoclonal (la movilidad depende de el tipo de molécula utilizada).
- Para evitar esta interferencia, los médicos deben tener en cuenta que la inyección del producto de contraste debe realizarse después de la extracción de sangre.
- Los productos de contraste no interfieren en la electroforesis de proteínas en gel de agarosa o la inmunofijación.

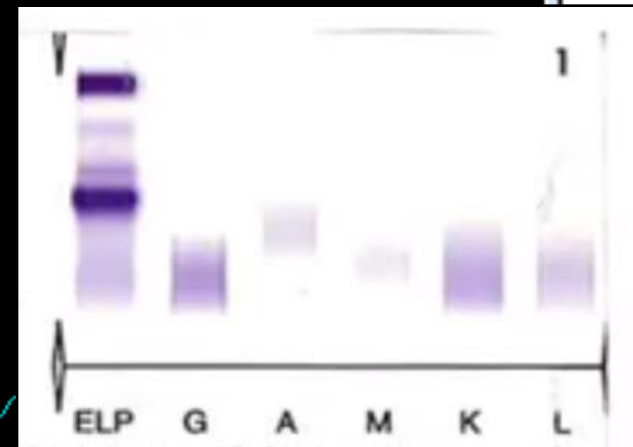
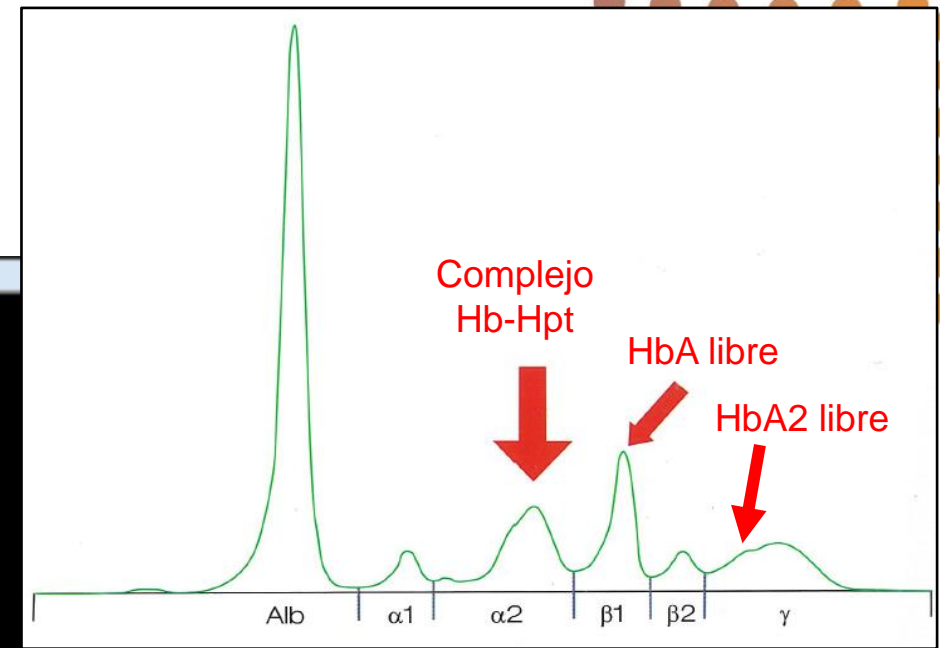


Beta-1

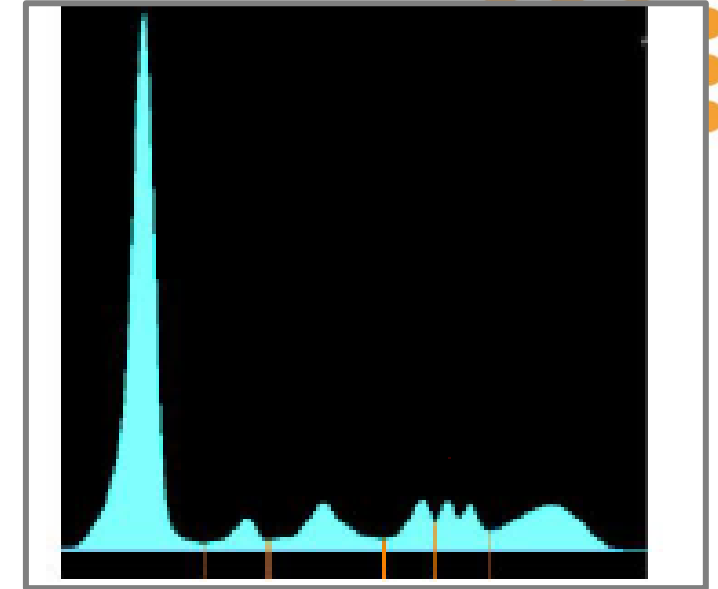
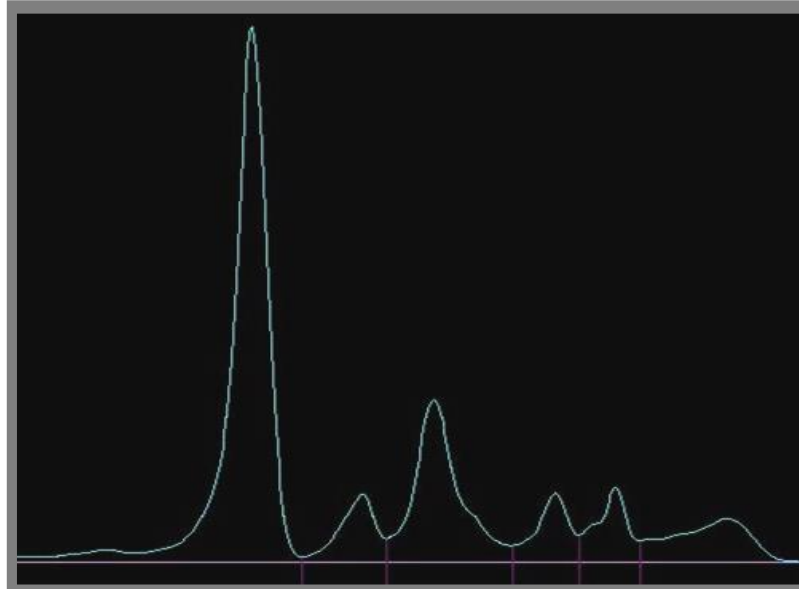
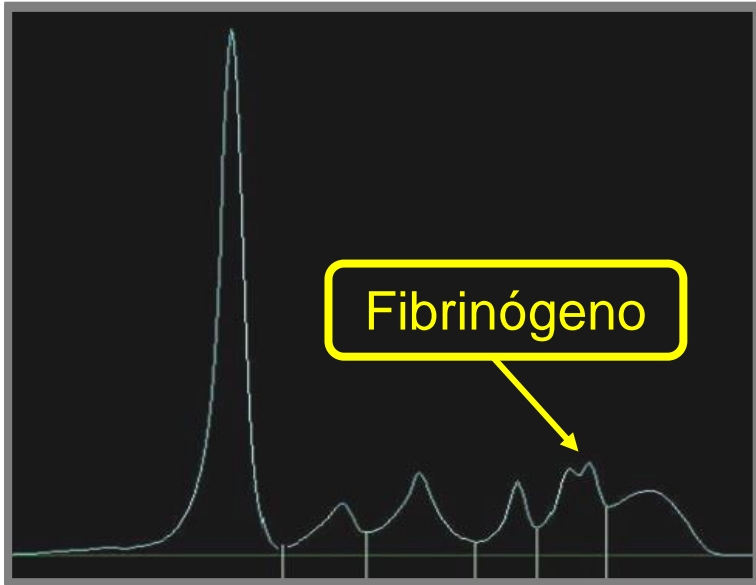
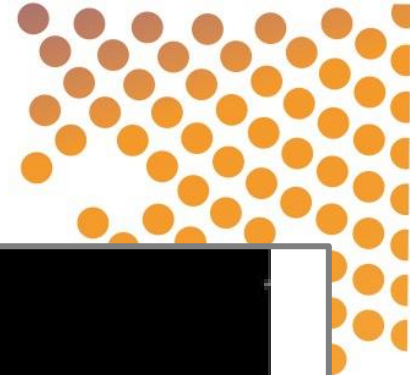
Minimum mode

O.D.Max : 0,631
Pos. No. : 1
Cap. : 5
Rack No. : 20
Read time : 15:28

- Hb libre = Hemólisis
- ↑ Transferrina = Deficiencia de hierro



Beta-2



- Muestra de plasma
- Alteraciones de la coagulación
- Terapia anticoagulante



- Evitar muestras de plasma para EPS
- Eliminar el fibrinógeno por precipitación con etanol, tratamiento con reptilasa

Eliminación del fibrinógeno

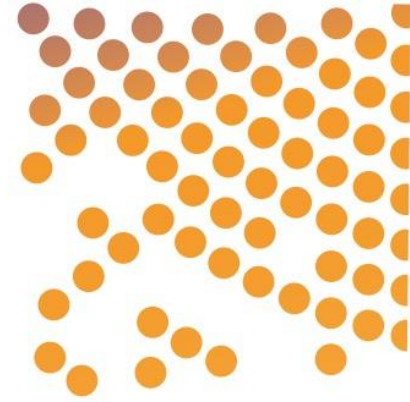
- **Precipitación del fibrinógeno con Etanol puro**

- 1) Dilución de la muestra con 10% etanol puro
- 2) Incubar la muestra 15 minutos en baño de hielo
- 3) Centrifugar 5 minutos a 4°C (1100g)
- 4) Reanalizar el sobrenadante

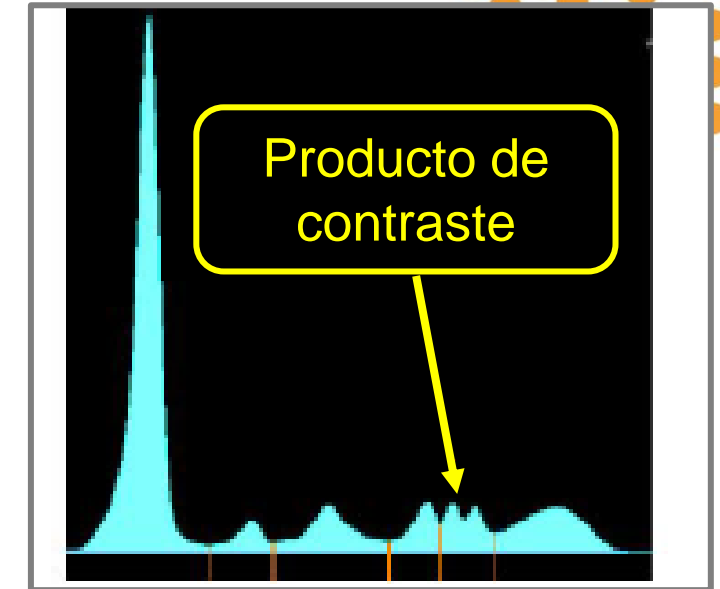
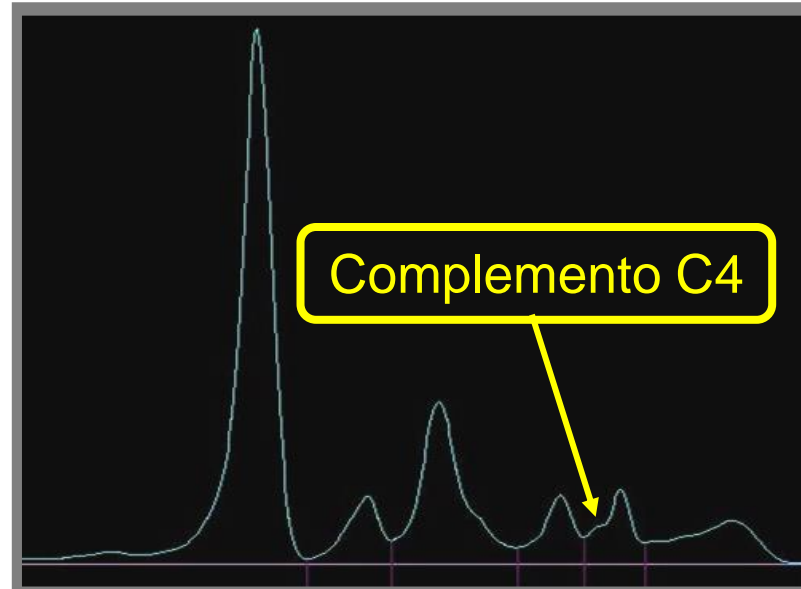
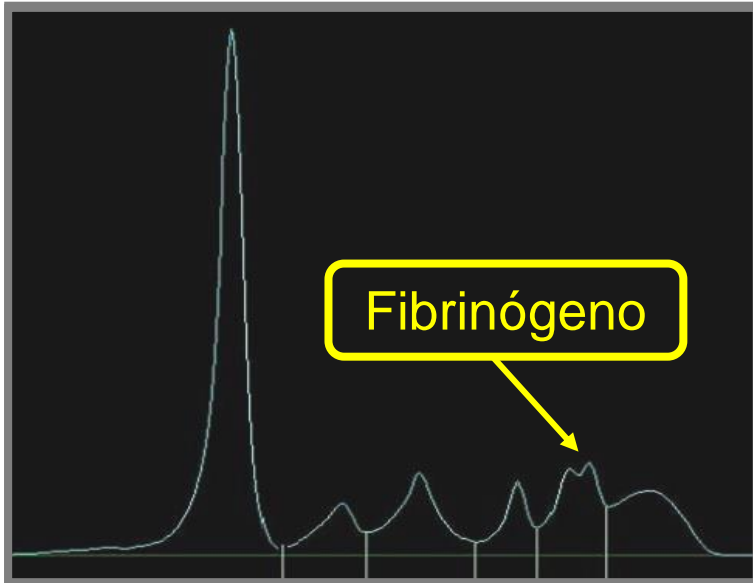


- **Tratamiento con Reptilasa** (STA Reptilase, Stago)

- 1) Dilución de reptilasa 1:10 en el plasma del paciente
- 2) Incubar 5 minutos a 37°C
- 3) Centrifugar 5 minutos a temperatura ambiente (20 000g)
- 4) Reanalizar el sobrenadante



Beta-2



- Muestra de plasma
- Alteraciones de la coagulación
- Terapia anticoagulante



- Evitar muestras de plasma para EPS
- Eliminar el fibrinógeno por precipitación con etanol

Contexto inflamatorio

Ejemplo: lomeprol



Repetir el análisis en una nueva muestra días después

Beta-2

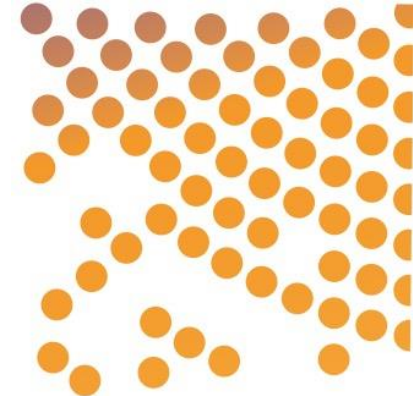
O.D.Max : 0,420
Pos. No. : 3
Cap. : 3
Rack No. : 3
Read time : 17:22

Beta-2 normal

O.D.Max : 0,710
Pos. No. : 1
Cap. : 1
Rack No. : 11
Read time : 12:31

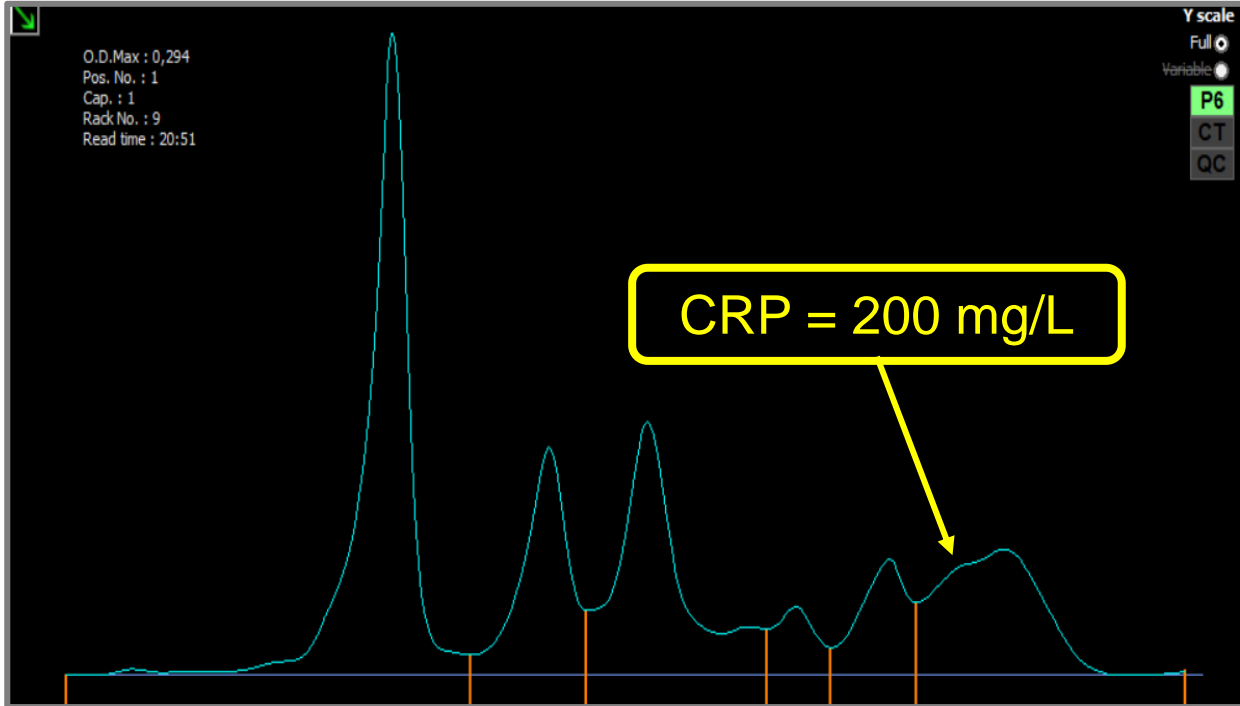
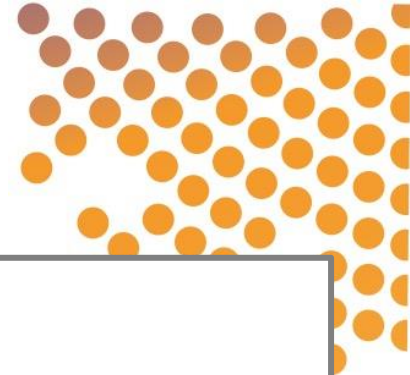
Beta-2 disminuída
(muestra degradada)

Estabilidad de las muestras de suero



- Las muestras pueden conservarse un máximo de 10 días en nevera (entre 2 y 8 °C)
- Los sueros congelados (- 18 / - 30 °C) son estables 2 meses
- A partir de 10 días en nevera o 3 días a temperatura ambiente:
 - la fracción alfa-2 puede estar ligeramente deformada
 - la fracción beta-1 se deforma ensanchándose
 - la fracción beta-2 disminuye progresivamente y puede aparecer deformada (con aparición de pequeños picos adicionales al lado de gamma y / o beta-1 debido a la degradación del complemento C3)
- La integración automática de las fracciones realizada Phoresis puede verse potencialmente perturbada

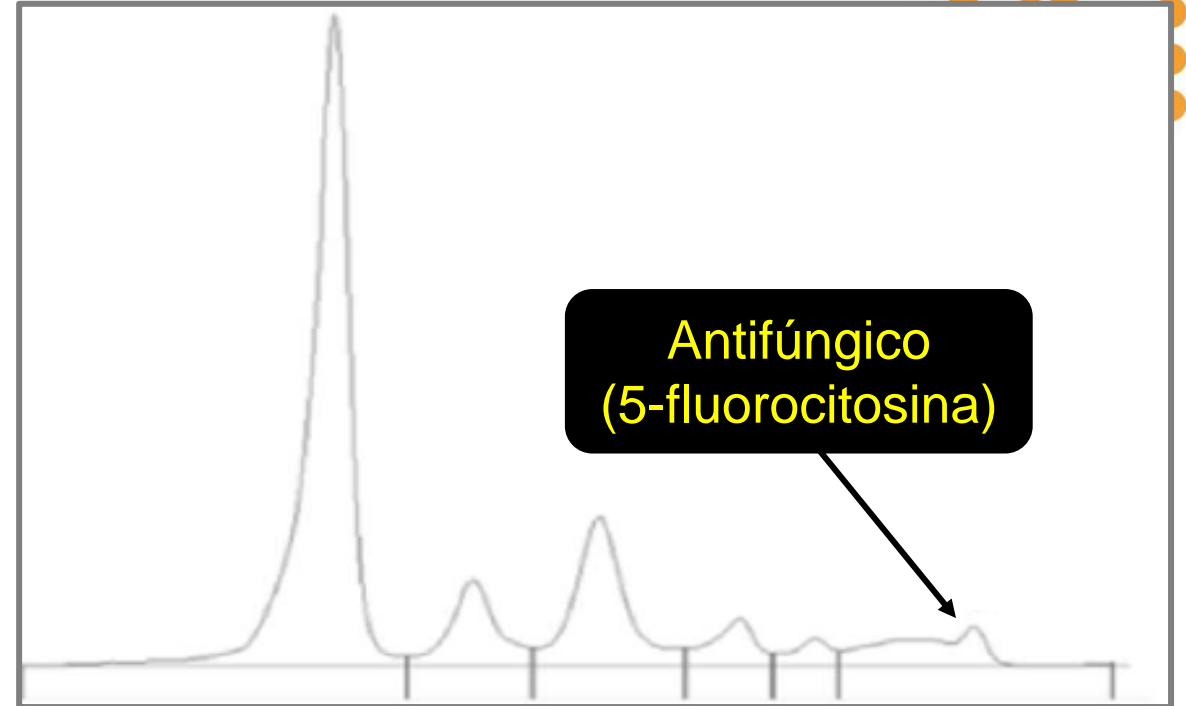
Gamma



Contexto inflamatorio



CRP es un marcador de infección bacteriana

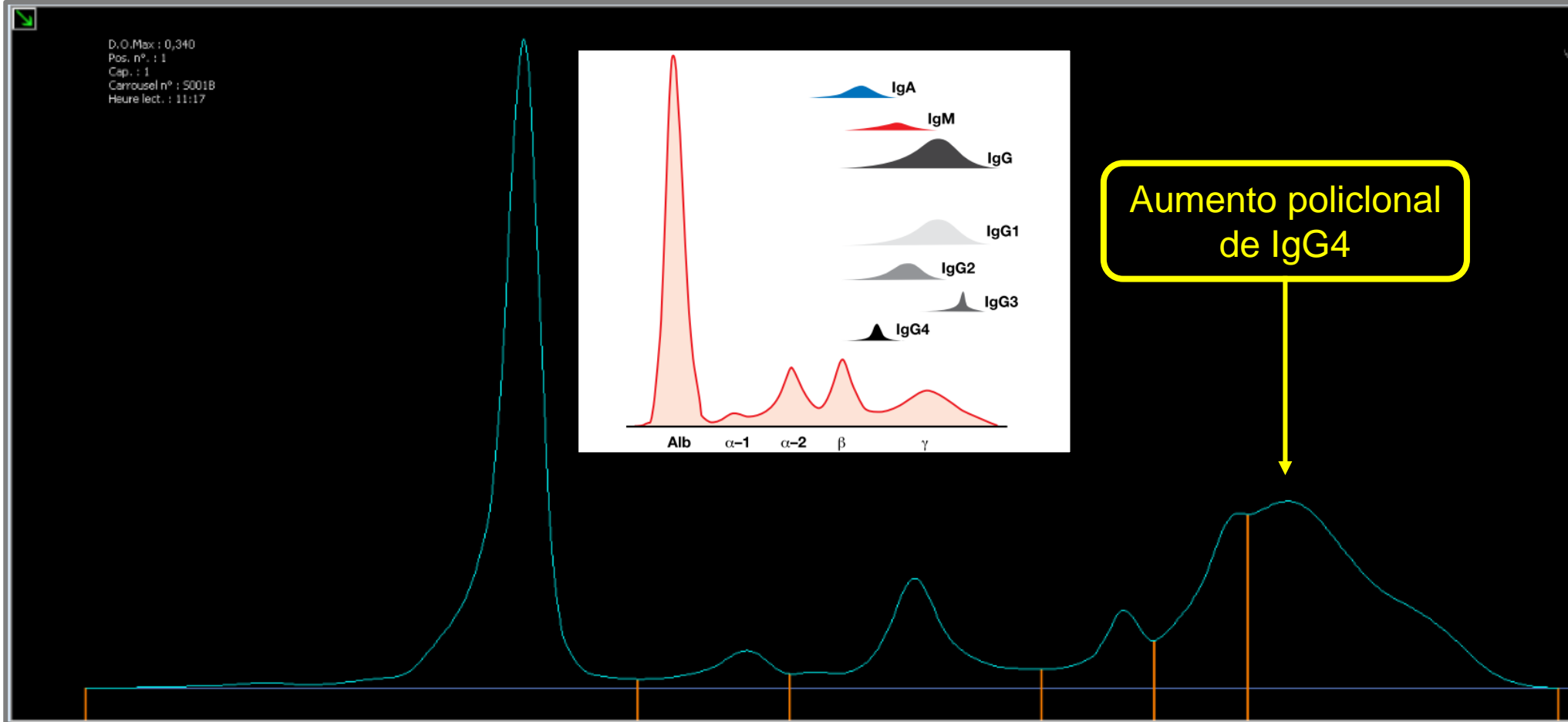
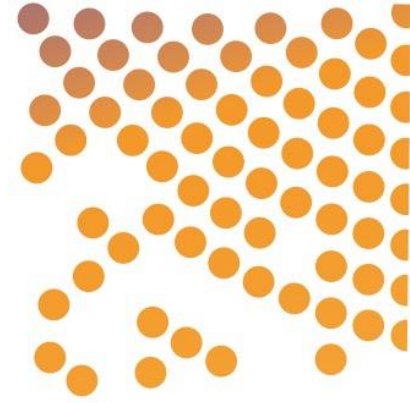


Ejemplo: 5-Fluorocitosina

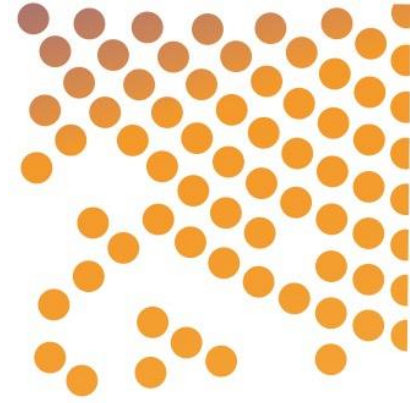


Repetir el análisis una vez finalizado el tratamiento antifúngico

Gamma

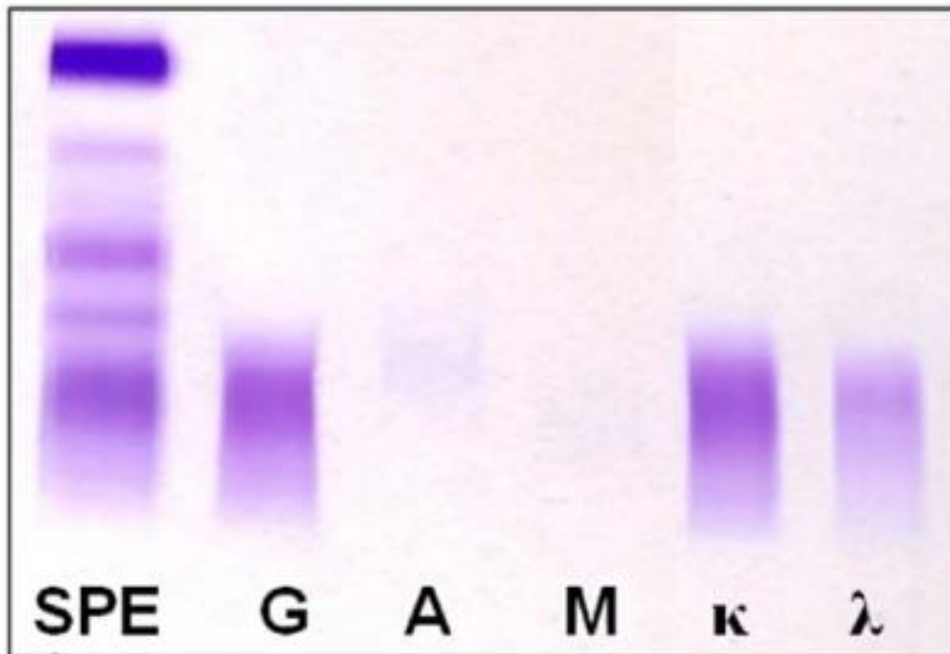


Aumento policlonal de IgG4

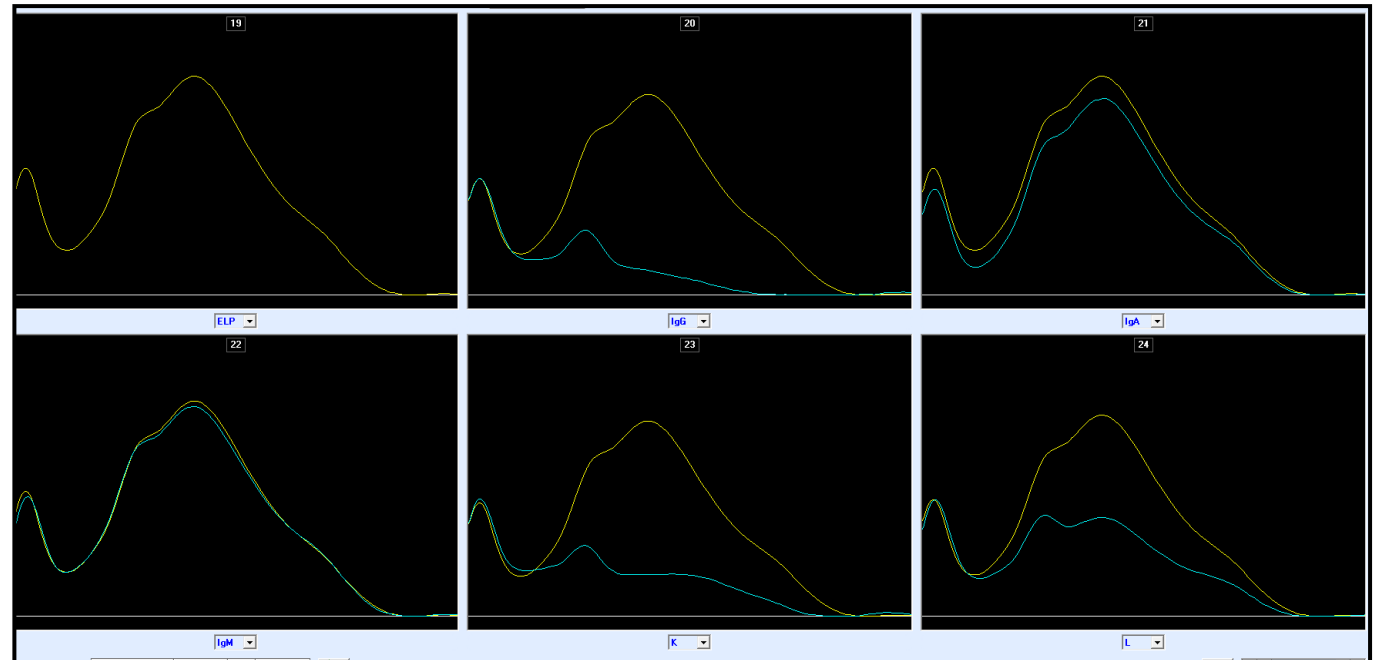


- La banda focalizada, que se detecta en la EPS, puede confirmarse como aumento policlonal de IgG4 por:

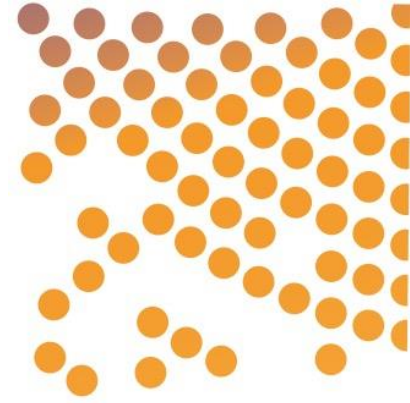
INMUNOFIJACIÓN



INMUNOTIPIFICACIÓN



Enfermedad relacionada con IgG4



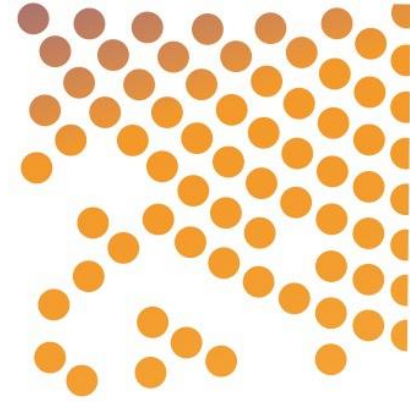
- La enfermedad relacionada con IgG4 (ER-IgG4) se utiliza para definir diversas enfermedades caracterizadas por:
 - infiltración linfoplasmocítica,
 - fibrosis,
 - presencia de un número aumentado de células IgG4+
 - y, en gran parte de los casos, **niveles aumentados de IgG4 sérica**
- Afecta frecuentemente el páncreas, las glándulas salivales y los ganglios linfáticos pero puede comprometer casi cualquier estructura de la anatomía humana.

Anticuerpos monoclonales

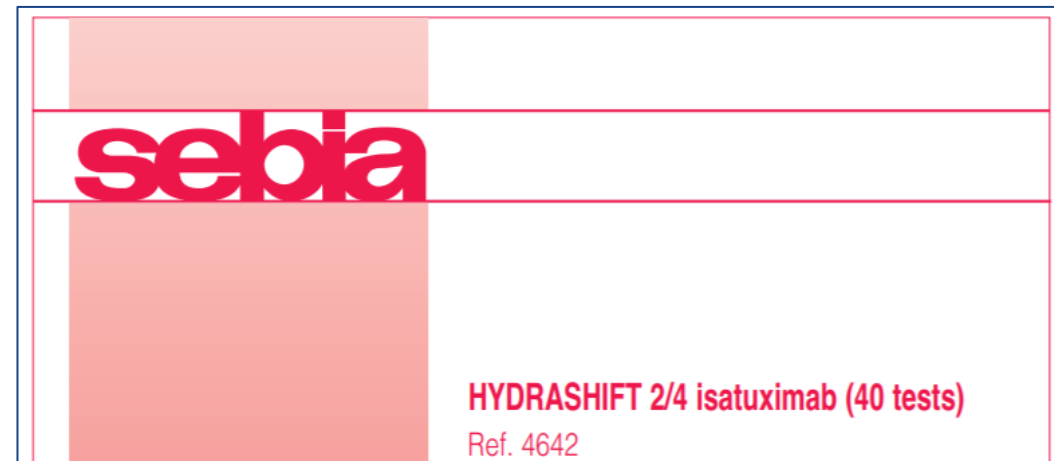
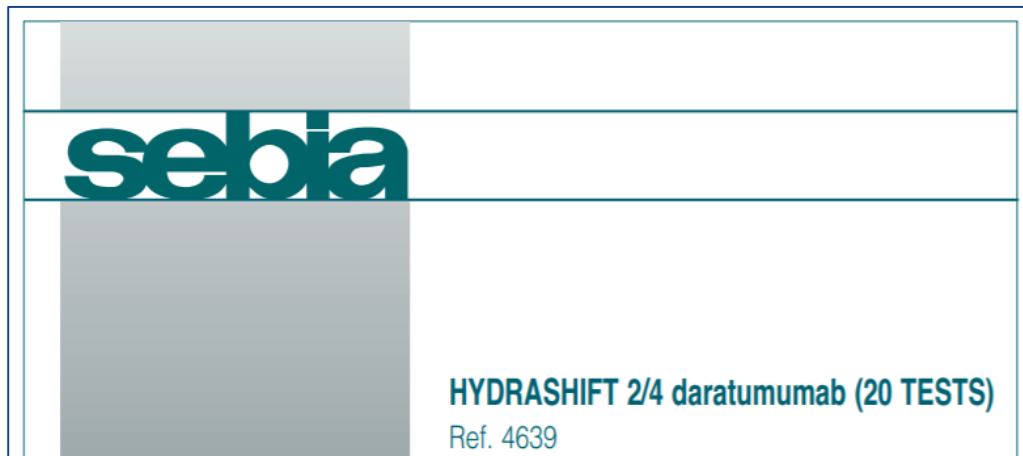
- Con el desarrollo continuo de nuevos anticuerpos monoclonales para el tratamiento de trastornos de las células plasmáticas, como el mieloma múltiple, existen varios medicamentos que pueden interferir con los análisis de rutina (EPS, IF) durante varias semanas después de la terapia.
- Fármacos como daratumumab e isatuximab (ambos anticuerpos monoclonales IgG kappa) pueden aparecer como una proteína monoclonal pequeña, con mayor frecuencia en concentraciones de hasta 1 g / L, cuando se usan en dosis terapéuticas.
- En estos pacientes, la co-migración del anticuerpo terapéutico y la proteína endógena puede dificultar la correcta evaluación de la proteína monoclonal endógena a través de la EPS y la IF.



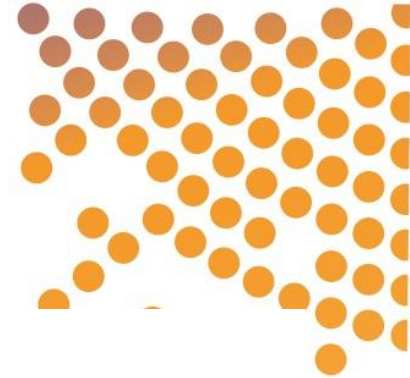
Anticuerpos monoclonales



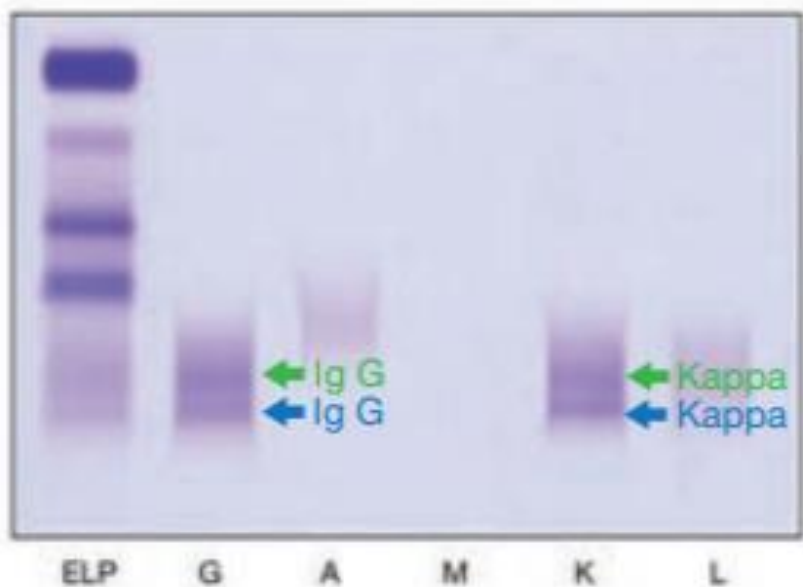
- Para evitar la interferencia por daratumumab o isatuximab, se puede utilizar la técnica **Hydrashift 2/4 Daratumumab** o **HYDRASHIFT 2/4 Isatuximab** de Sebia
- Se utiliza un anticuerpo dirigido contra daratumumab o isatuximab para cambiar la posición de migración del anticuerpo terapéutico durante la electroforesis



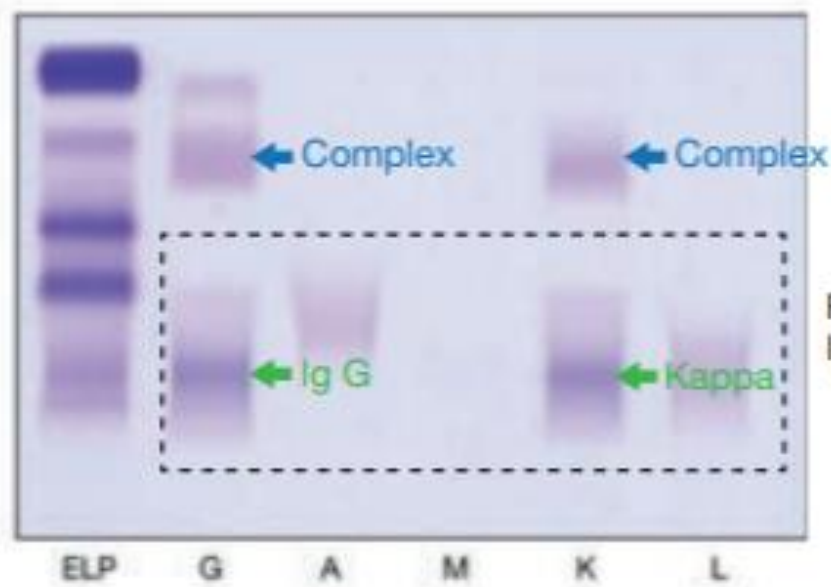
Hydrashift 2/4 Daratumumab



Suero con Ig G, Kappa (←) y daratumumab (←)



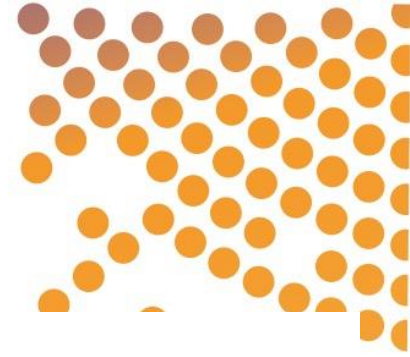
HYDRAGEL IF



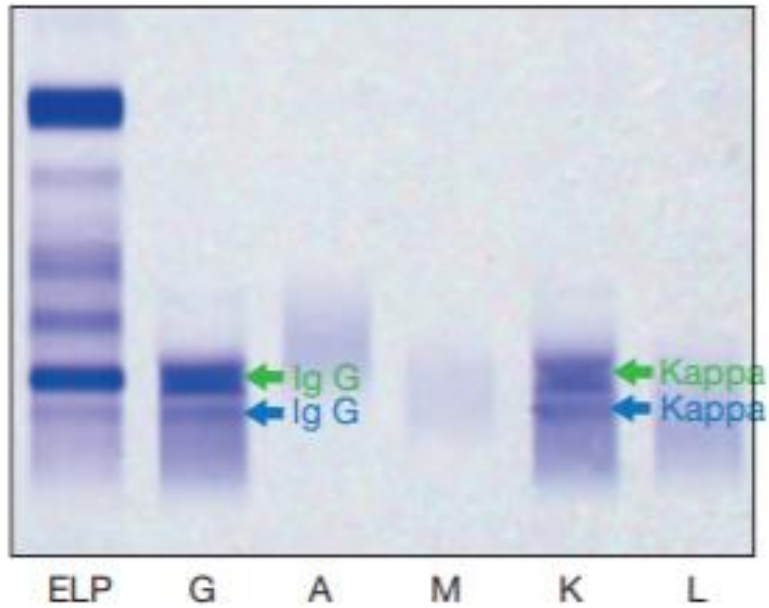
HYDRASHIFT 2/4 daratumumab

Resultado positivo:
Ig G, Kappa

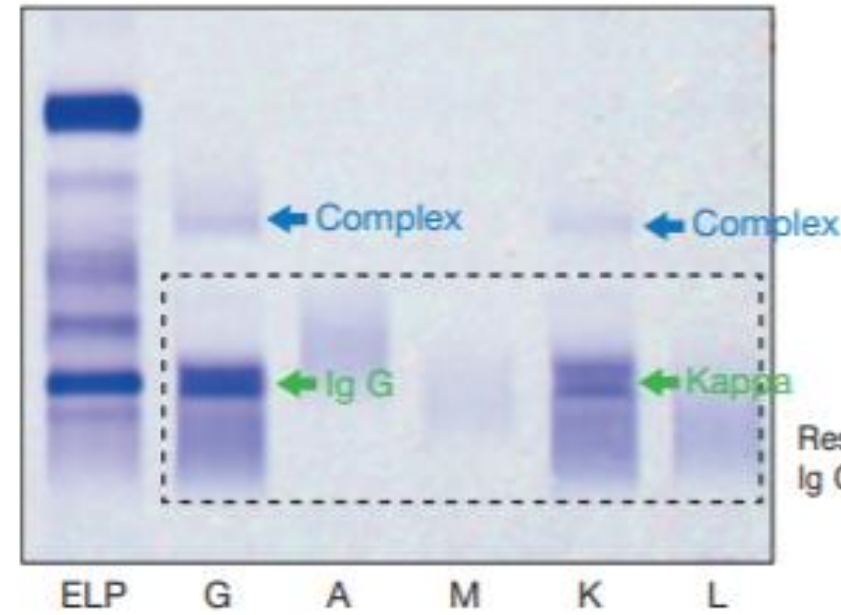
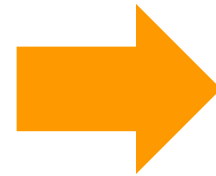
HYDRASHIFT 2/4 Isatuximab



Suero con Ig G, Kappa (←) y isatuximab (←)



HYDRAGEL IF



Resultado positivo:
Ig G, Kappa

HYDRASHIFT 2/4 isatuximab



MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCION

Nieves SANZ
Asesora Científica
nsanz@sebia.com