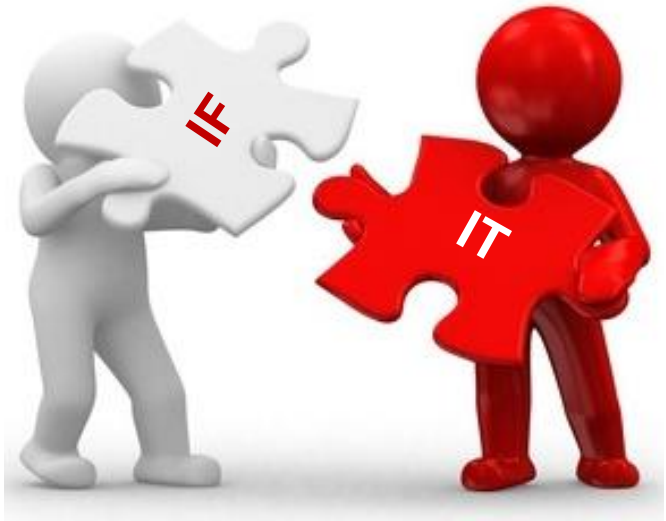


Inmunofijación e inmunotipado: ¿Son diferentes o complementarios?

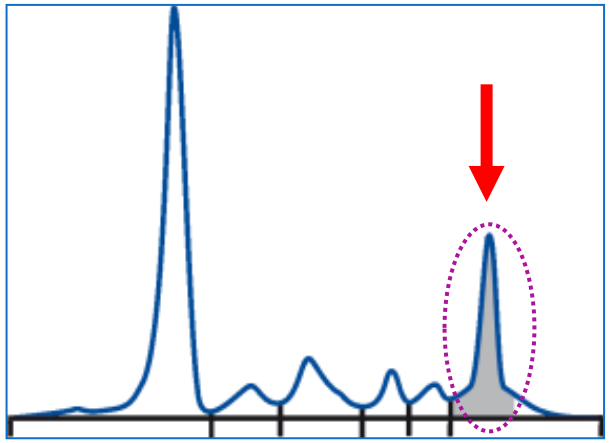
Ruben Doroteo Alvillar

Market Development Manager LATAM

Gerente de Desarrollo de Mercado LATAM

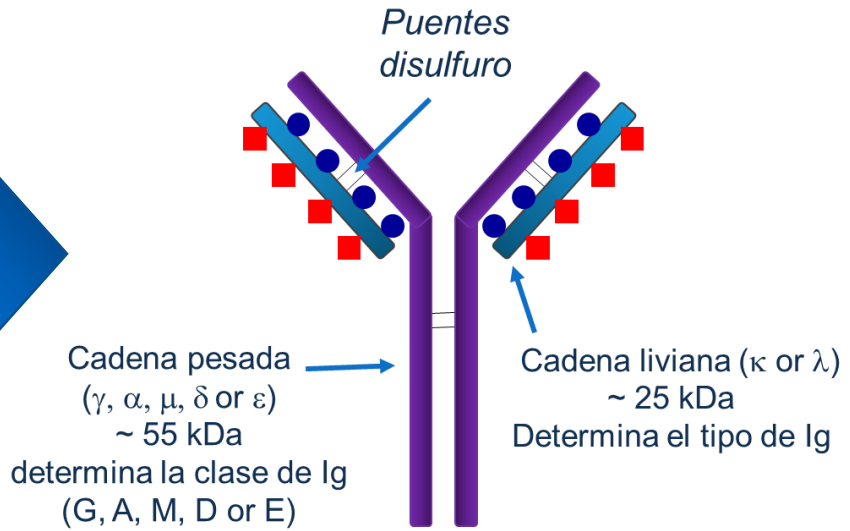
rdoroteo@sebia.com

Diagnóstico del paciente



DIAGNÓSTICO

Identificación cualitativa y/o cuantitativa en la EPS

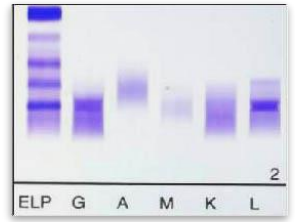


CARACTERIZACIÓN

Identificación de la cadena pesada y cadena ligera involucrada

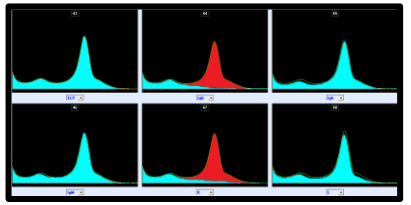
INMUNOFIJACIÓN (IF)

Cadenas pesadas:
IgG, IgA, IgM, IgD e IgE
Cadena ligeras totales:
Kappa y Lambda
Cadenas ligeras libres:
Kappa y Lamda



INMUNOTIPADO (IT):

Cadenas pesadas:
IgG, IgA e IgM
Cadenas ligeras totales:
Kappa y Lambda

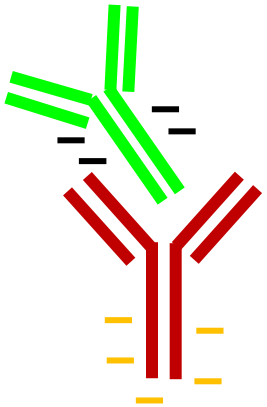


Inmunotipificación o Inmunotipado (IT)

Fundamentos

Principio de la prueba

Antisuero:
IgG, IgA, IgM,
Kappa y Lambda



Ig en el suero

+

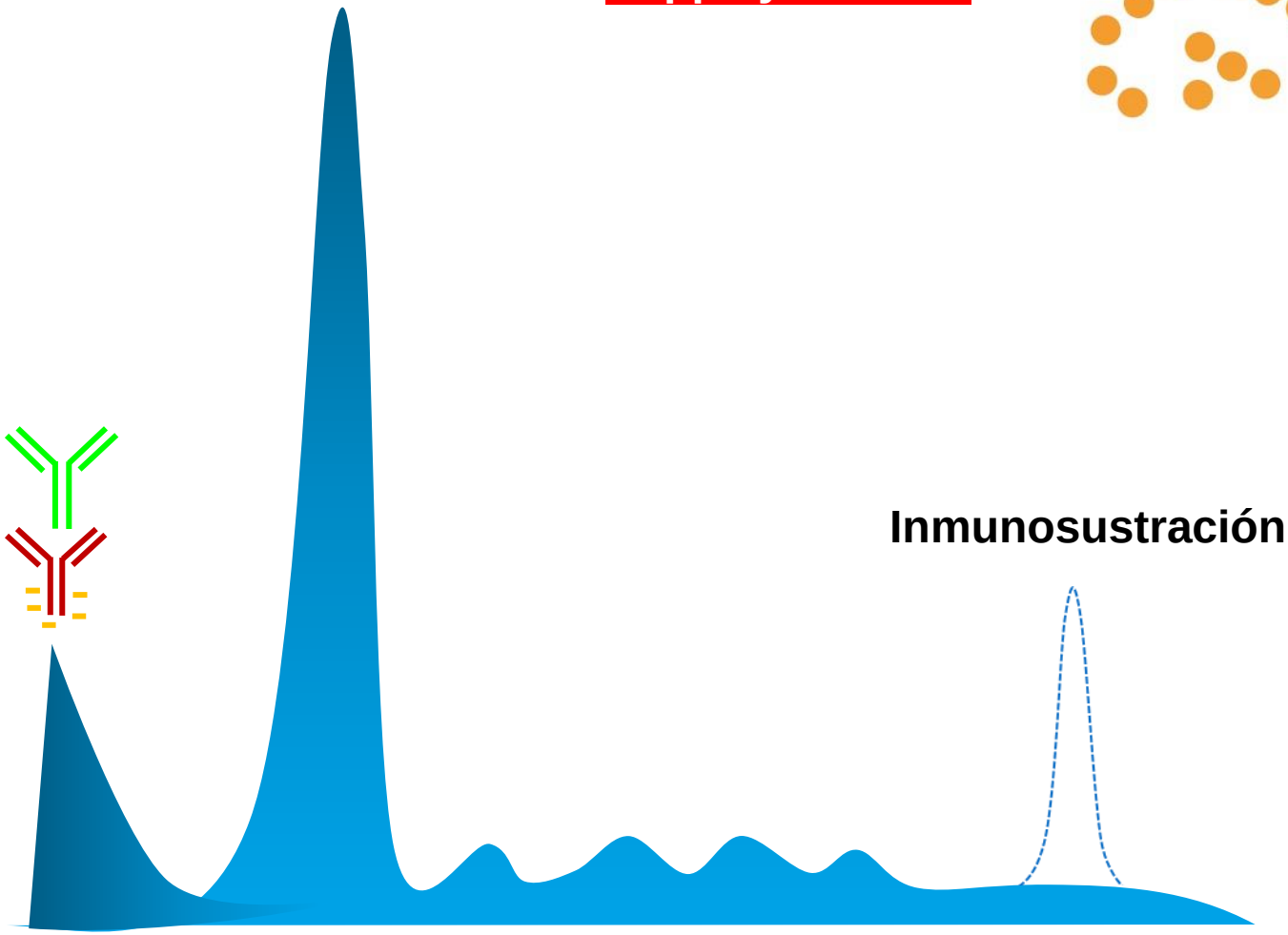
Antisuero (reactivo)

↓

IMMUNOCOMPLEJO
Altamente cargado negativamente

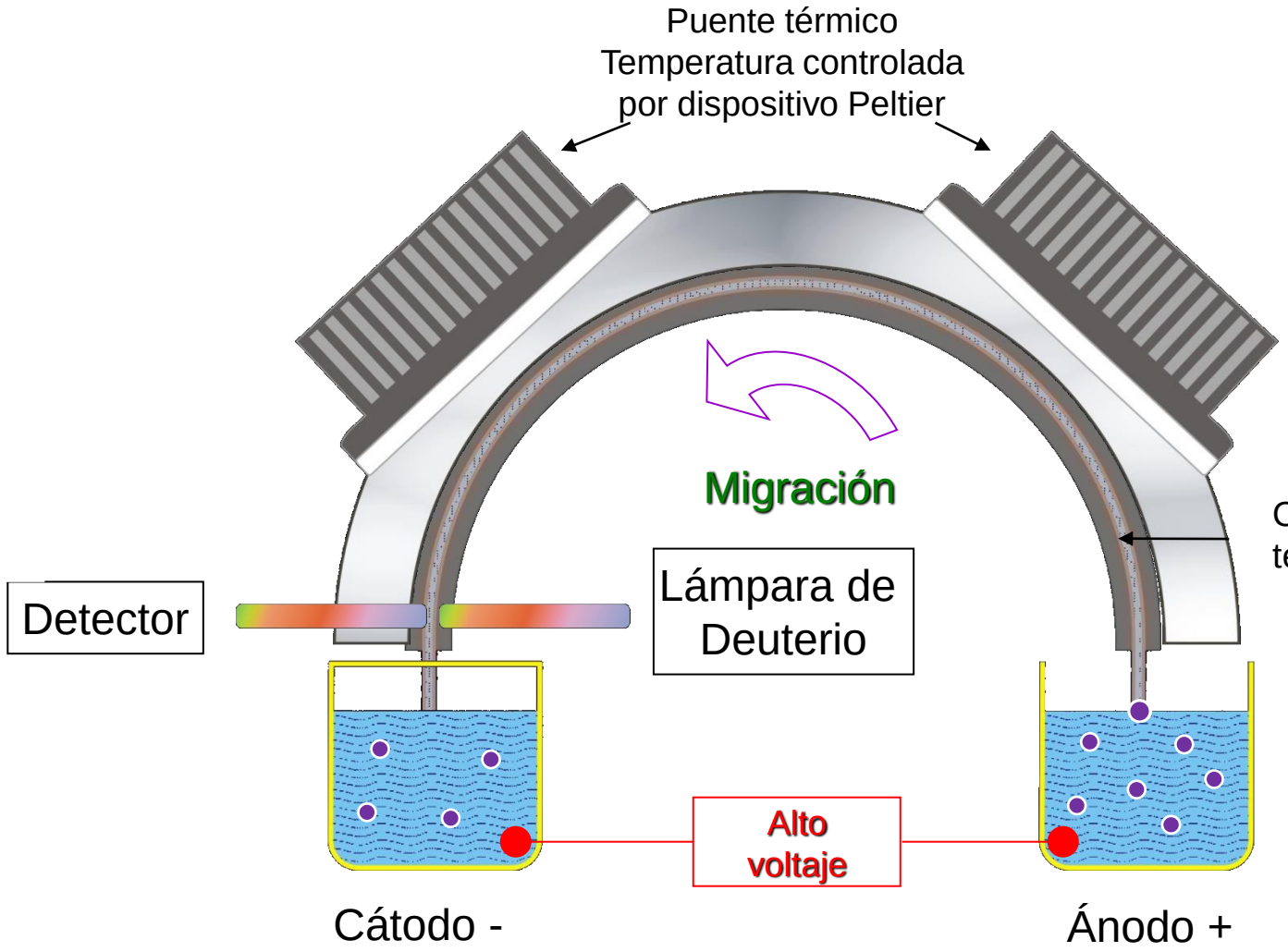
↓

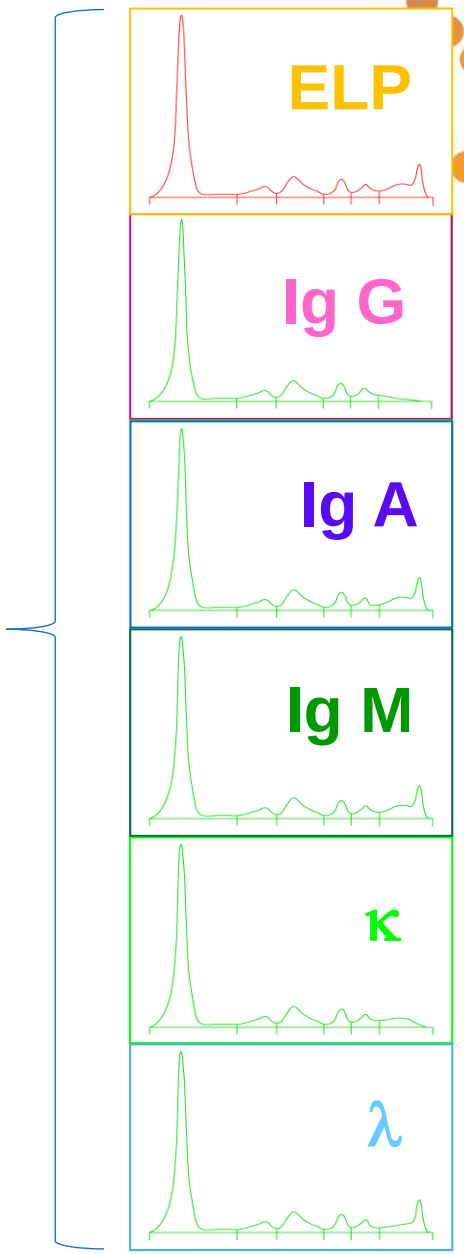
Migración del inmunocomplejo a posición anódica de la curva (cerca de la albúmina)



Inmunosustración

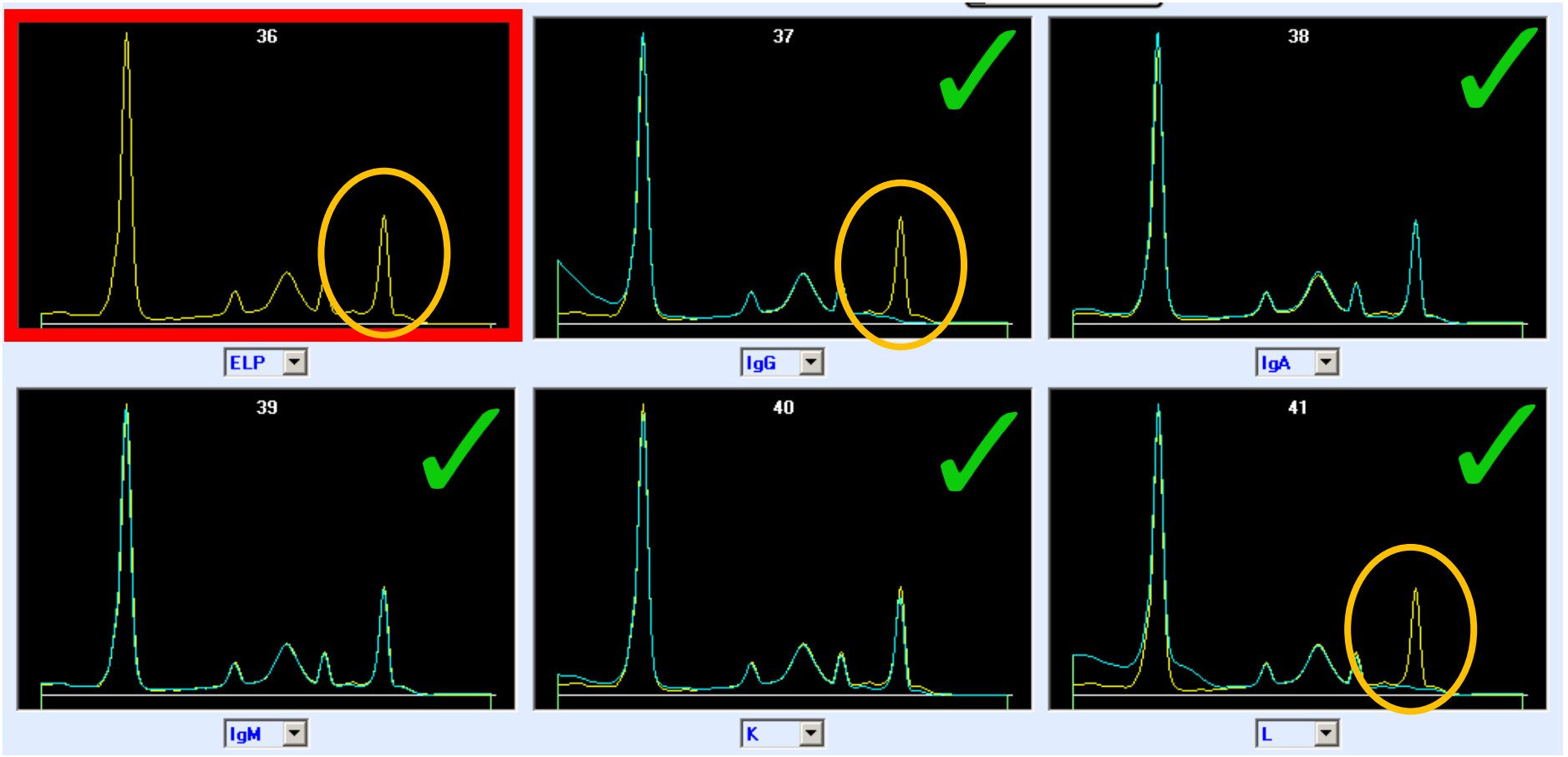
Teoría de la Electroforesis Capilar - IT





Guía de interpretación IT

- Examinar cuidadosamente el **patrón de referencia (ELP)** y localizar la **anormalidad**
- Comparar la curva de **muestra con antisuero** (azul) con la superposición de la curva del **patrón de referencia (amarillo)**
- Localizar la **ausencia o reducción** del componente monoclonal

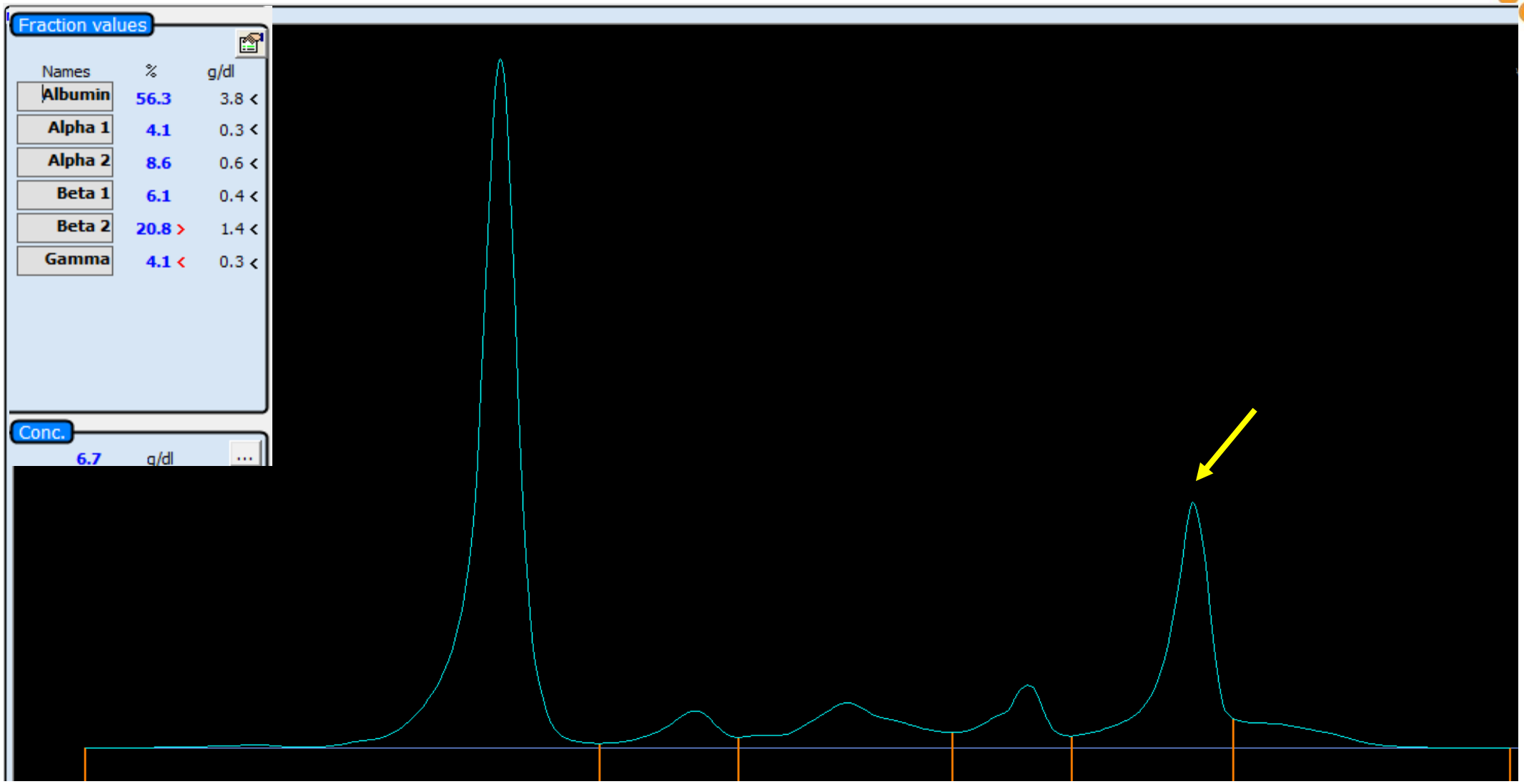


IgG lambda

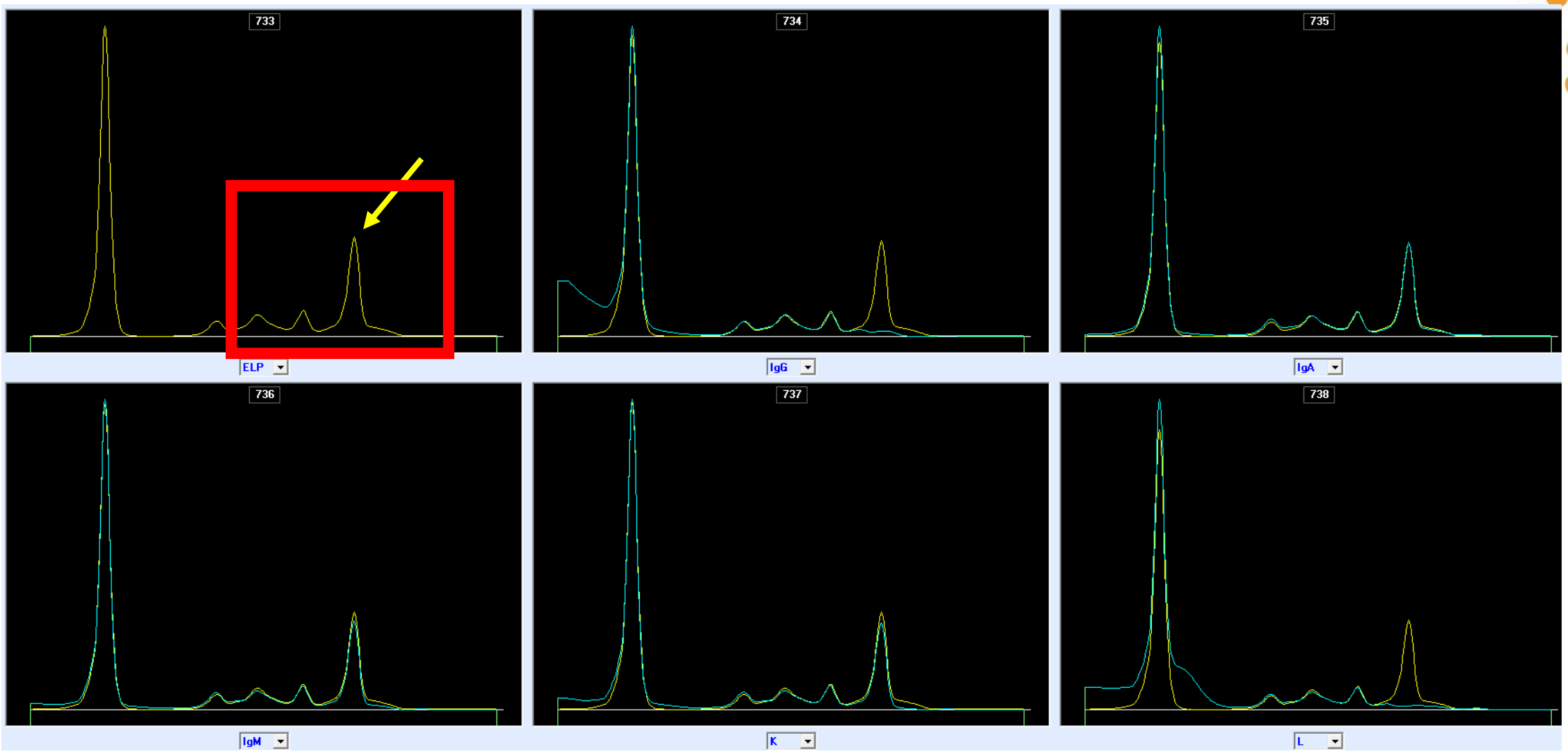
Comparación de resultados

IT e IF

Componente monoclonal Alta concentración

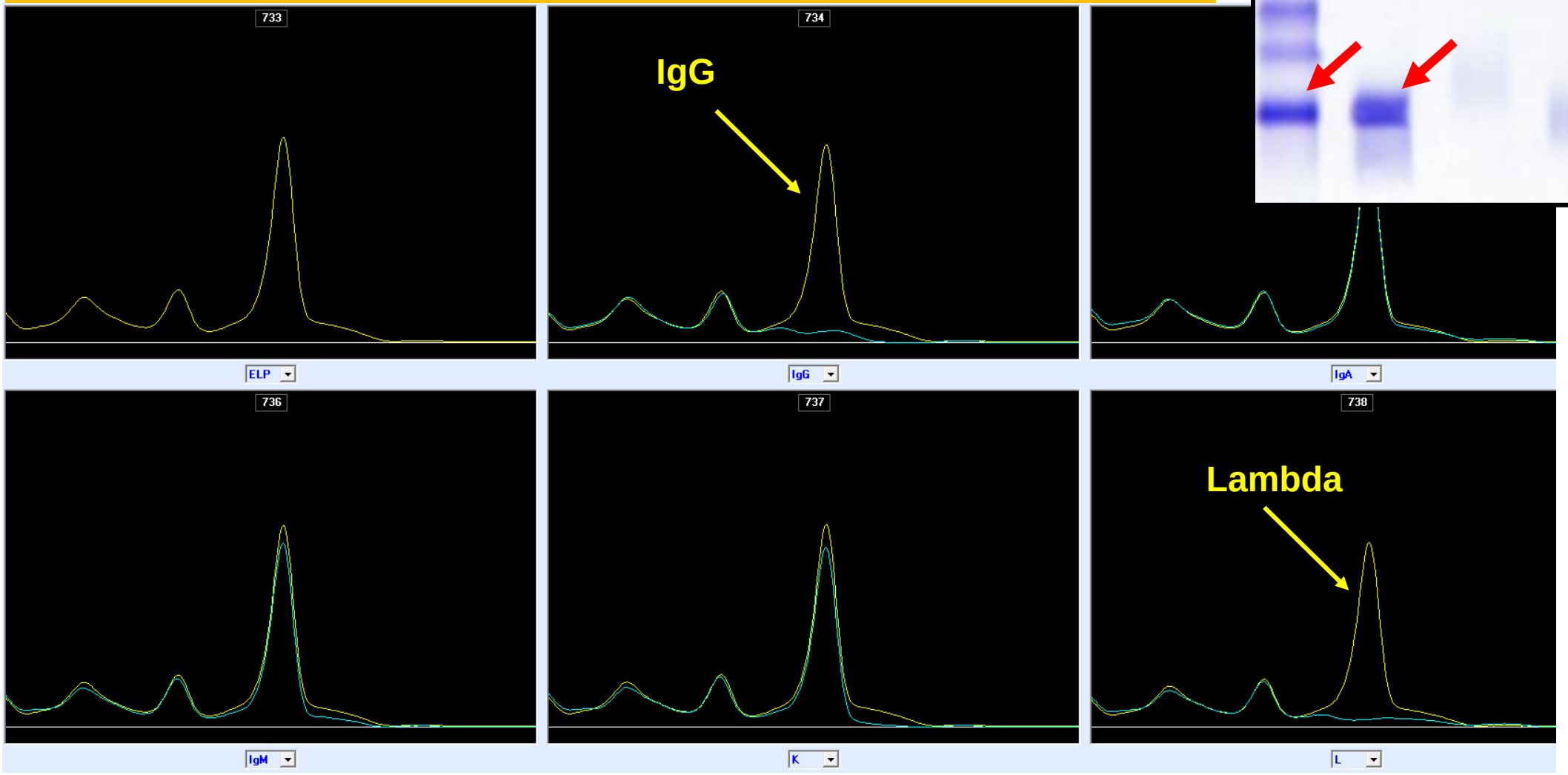


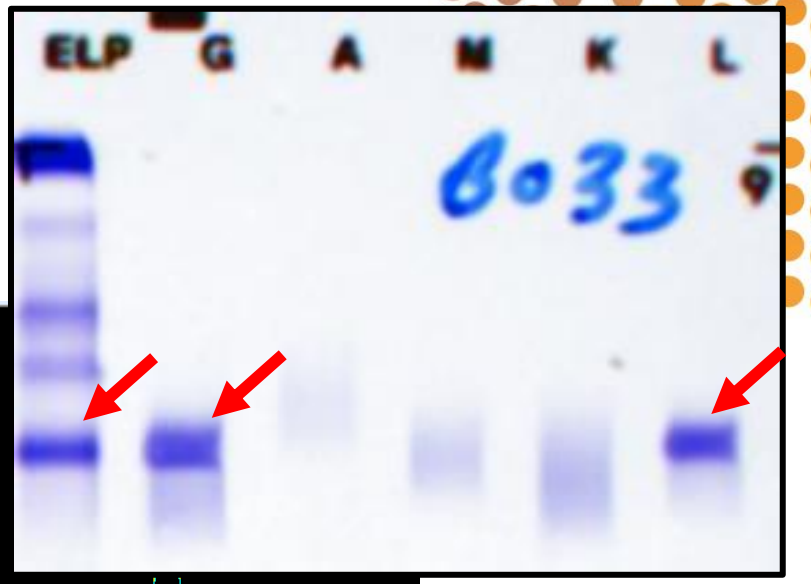
Inmunotipado sin Zoom



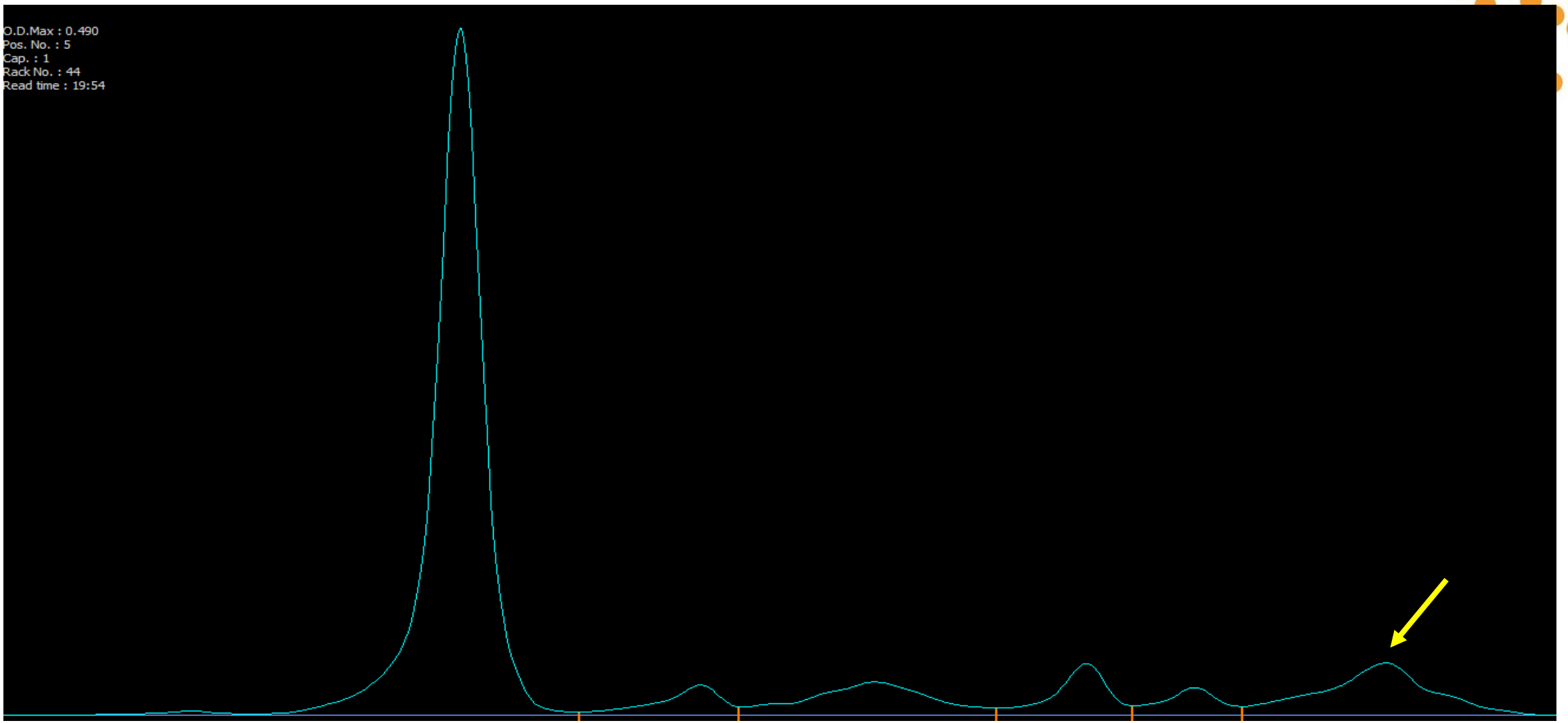
Inmunotipado con Zoom

MISMA INTERPRETACIÓN EN AMBAS TÉCNICAS:
El resultado de la inmunofijación (IF) es igual a la Inmunotipificación (IT)

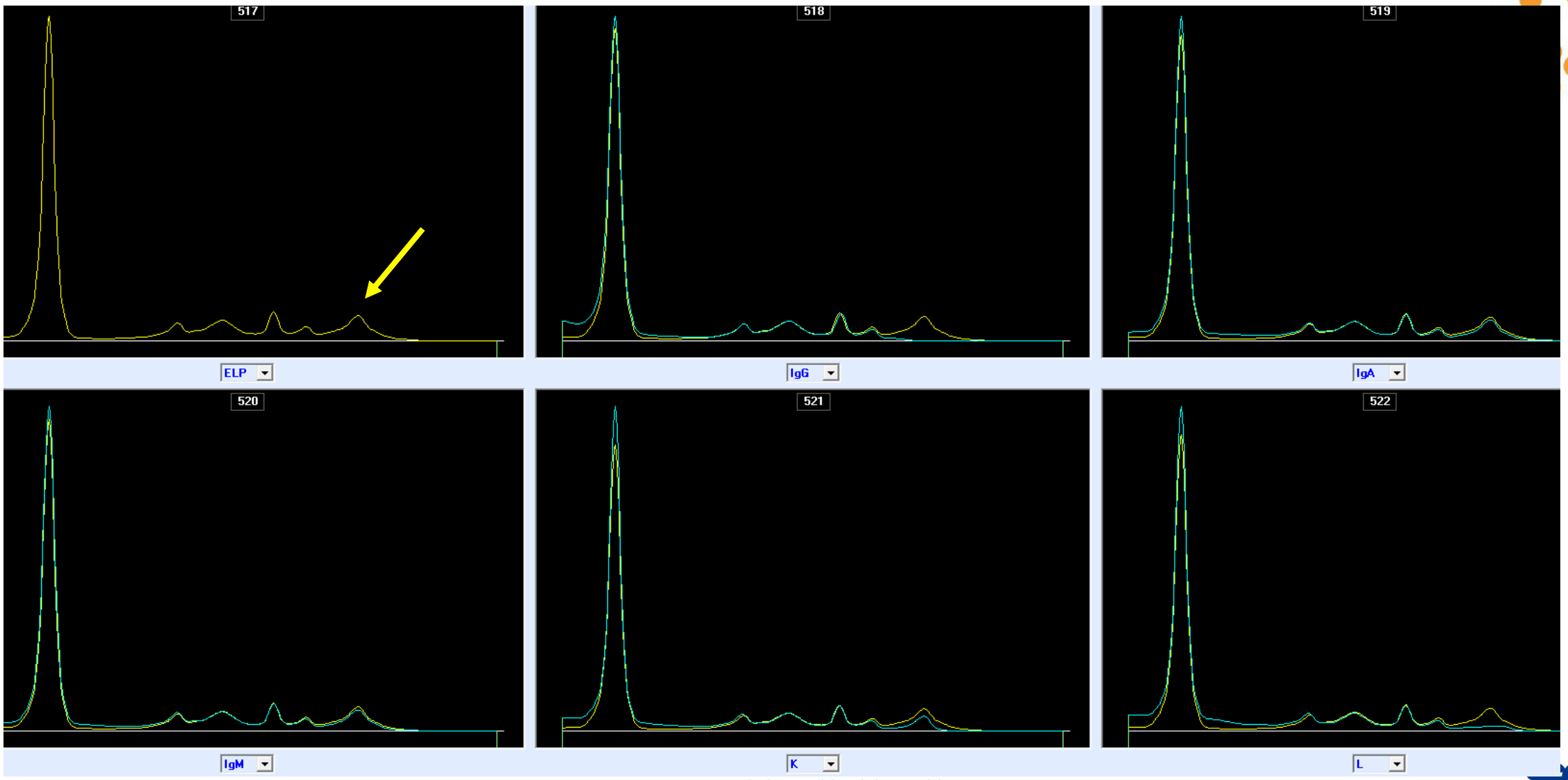




Componente monoclonal Baja concentración

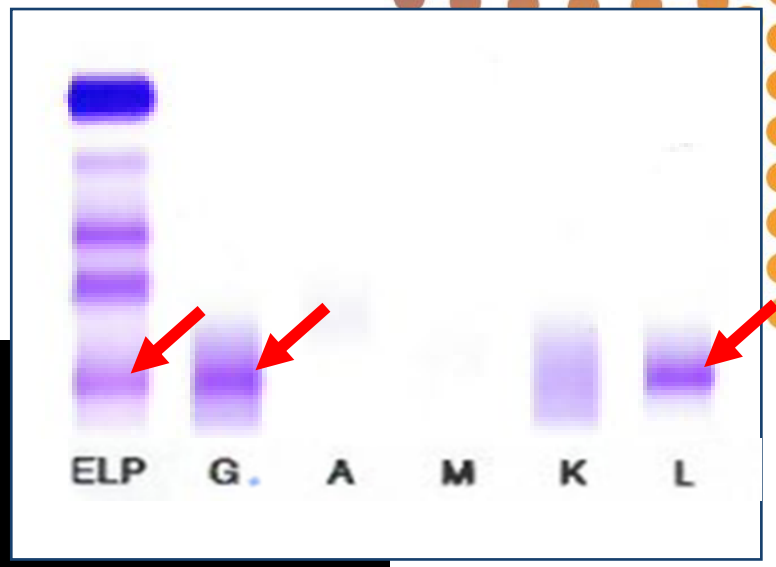


Inmunotipado sin Zoom



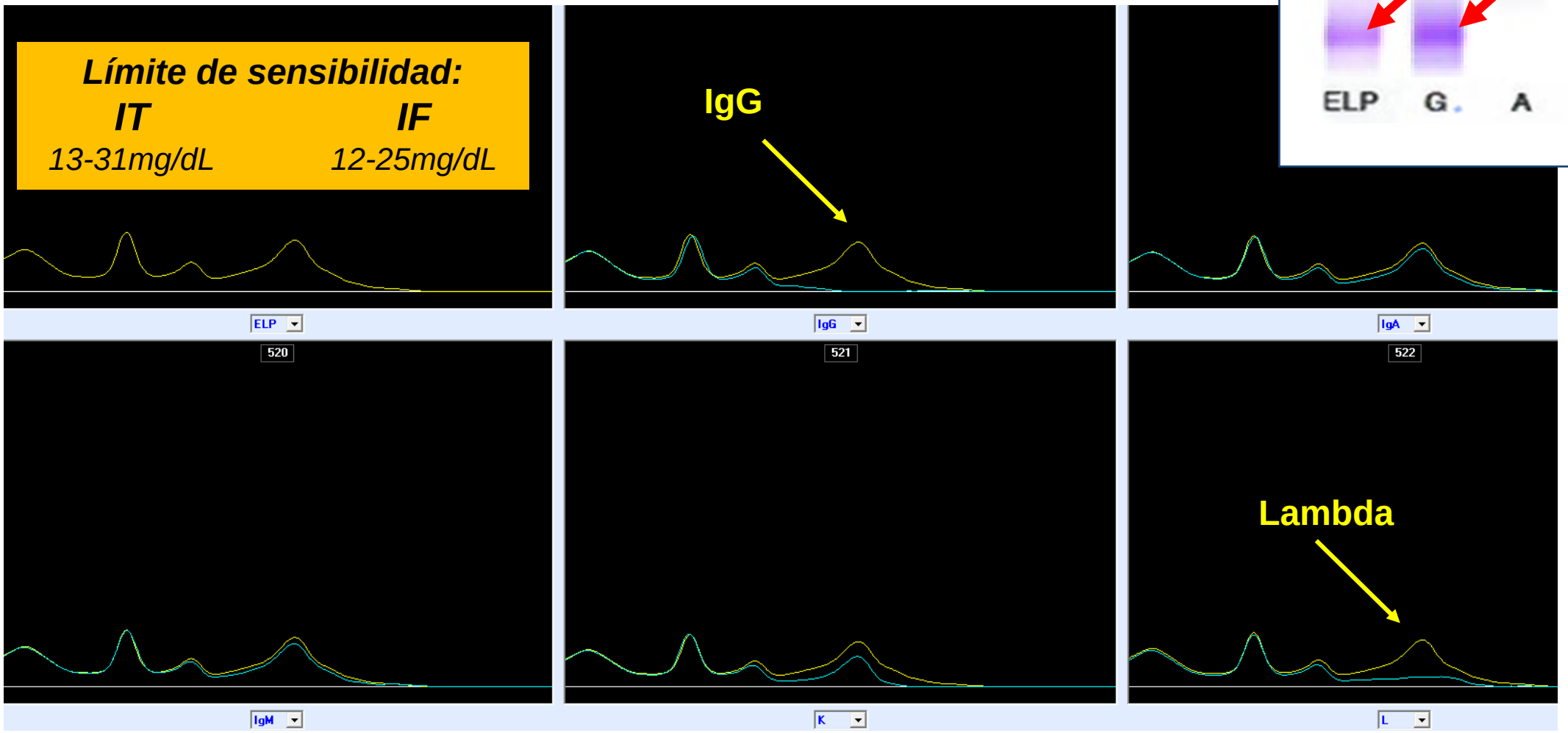
Inmunotipado con Zoom

MISMO RESULTADO EN PRESENCIA DE UN PICO MONOCLONAL DE BAJA CONCENTRACIÓN



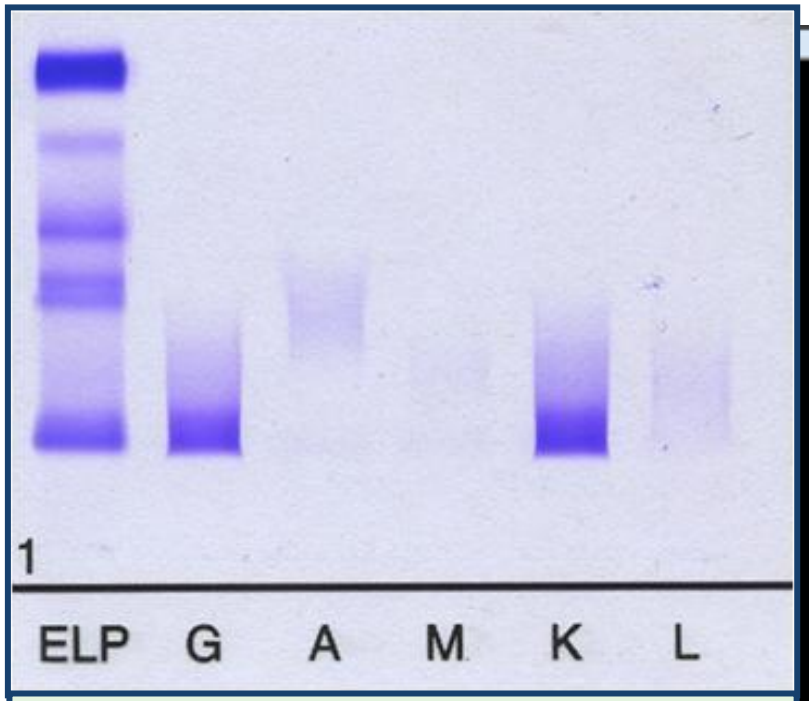
Límite de sensibilidad:

IT	***IF***
13-31mg/dL	*12-25mg/dL*



Comparación de la resolución

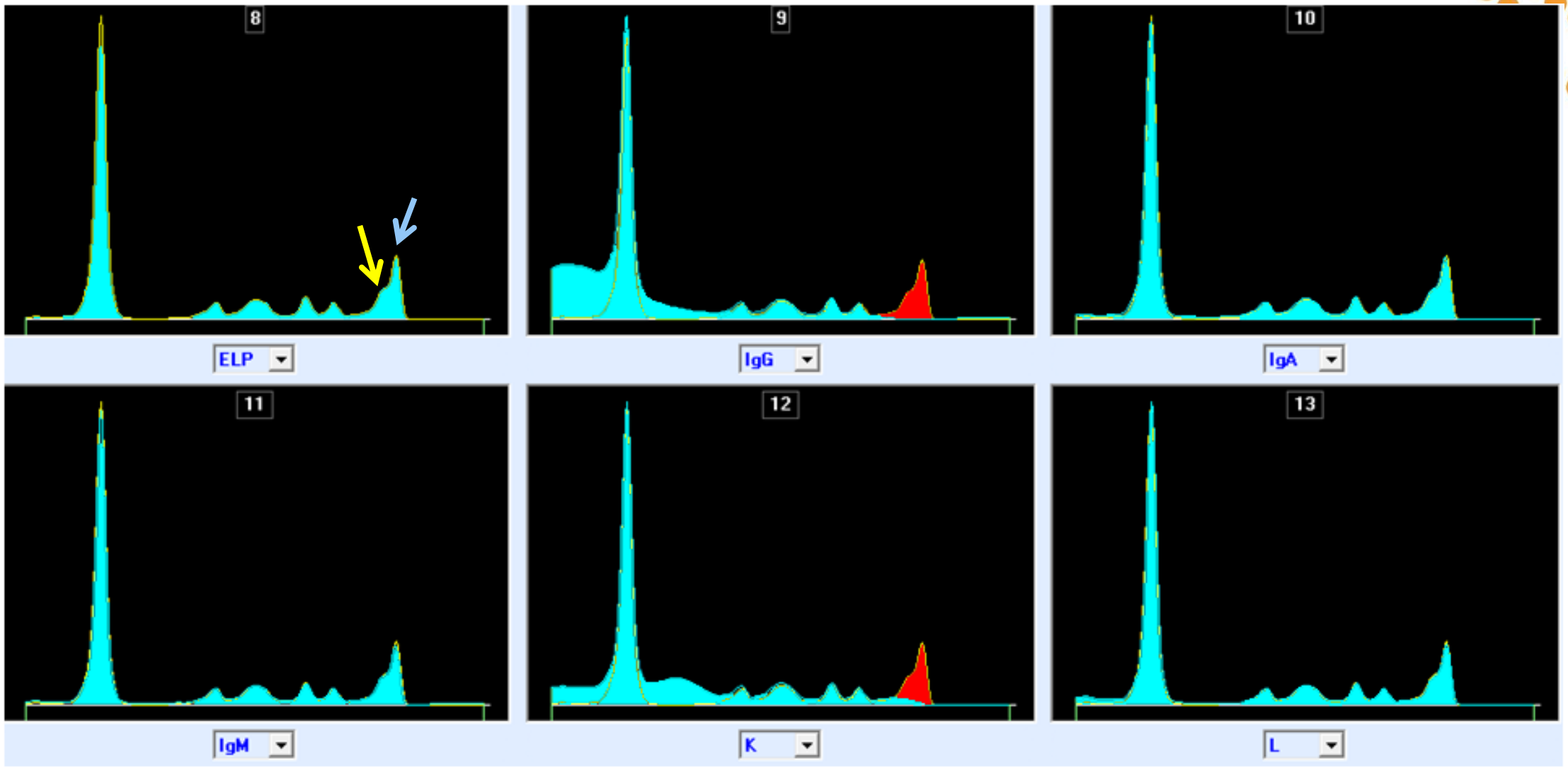
Gel de agarosa y Electroforesis capilar



¿IgG Kappa?

2 anormalidades en la electroforesis de proteínas en fracción gamma

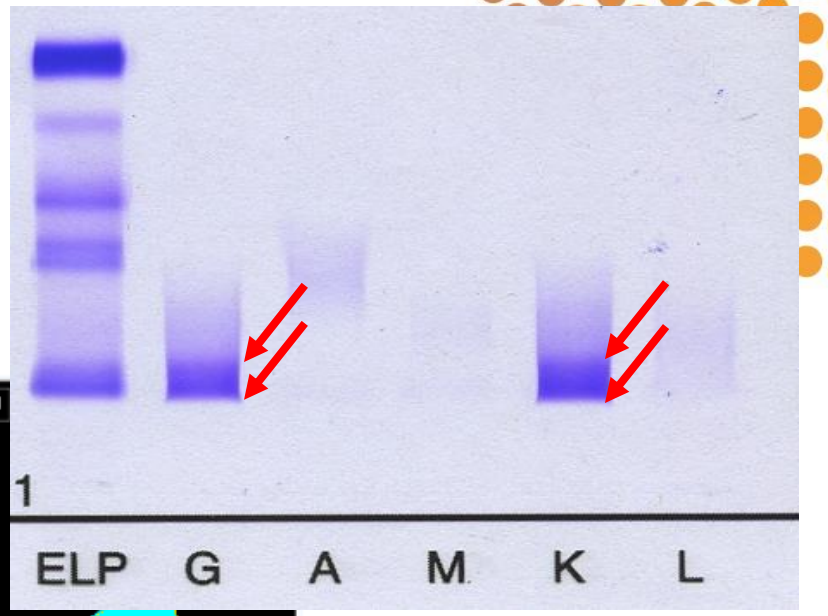
Inmunotipado sin Zoom

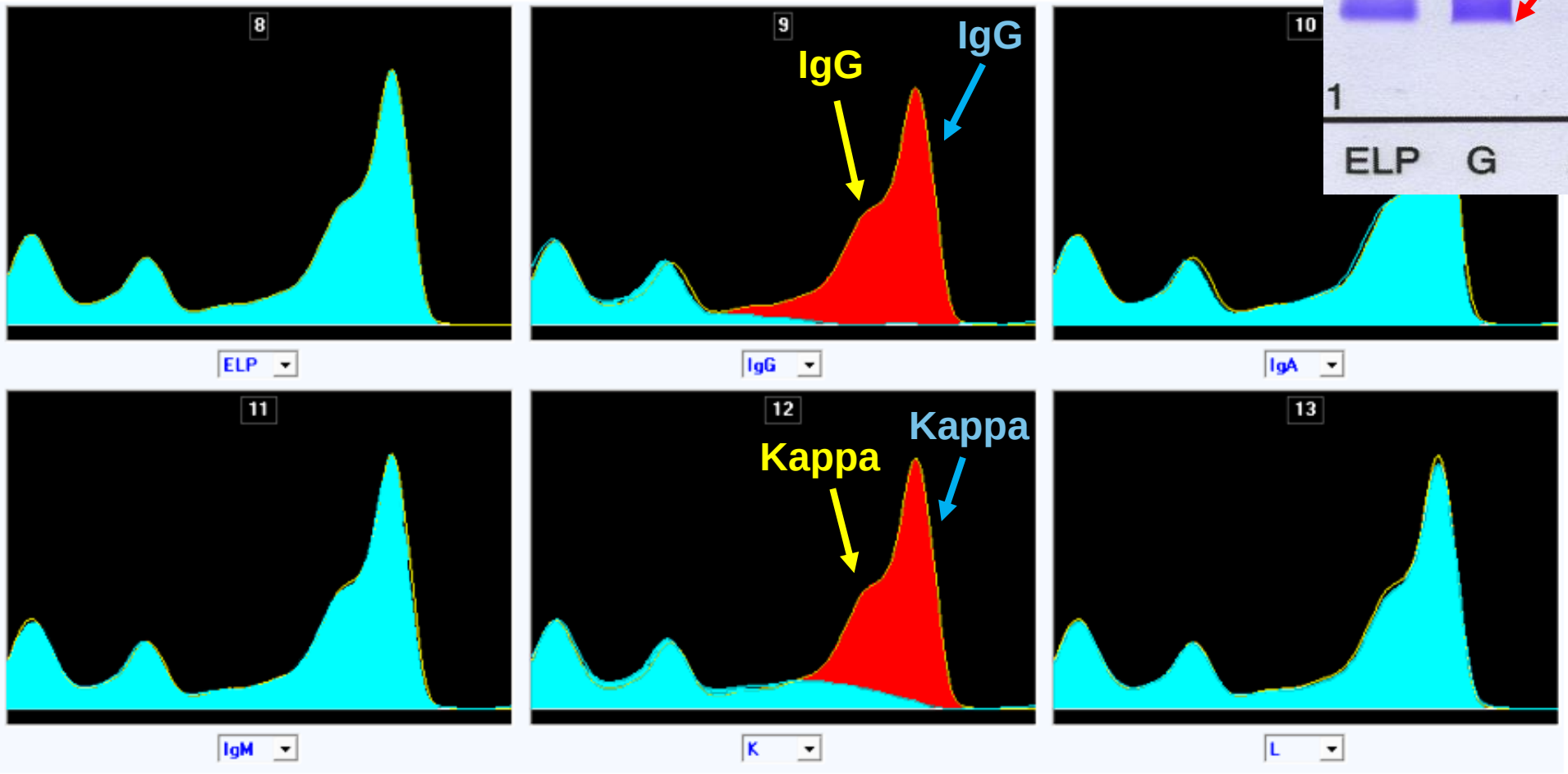


Inmunotipado con Zoom

LA RESOLUCIÓN DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR ES SUPERIOR AL GEL DE AGAROSA

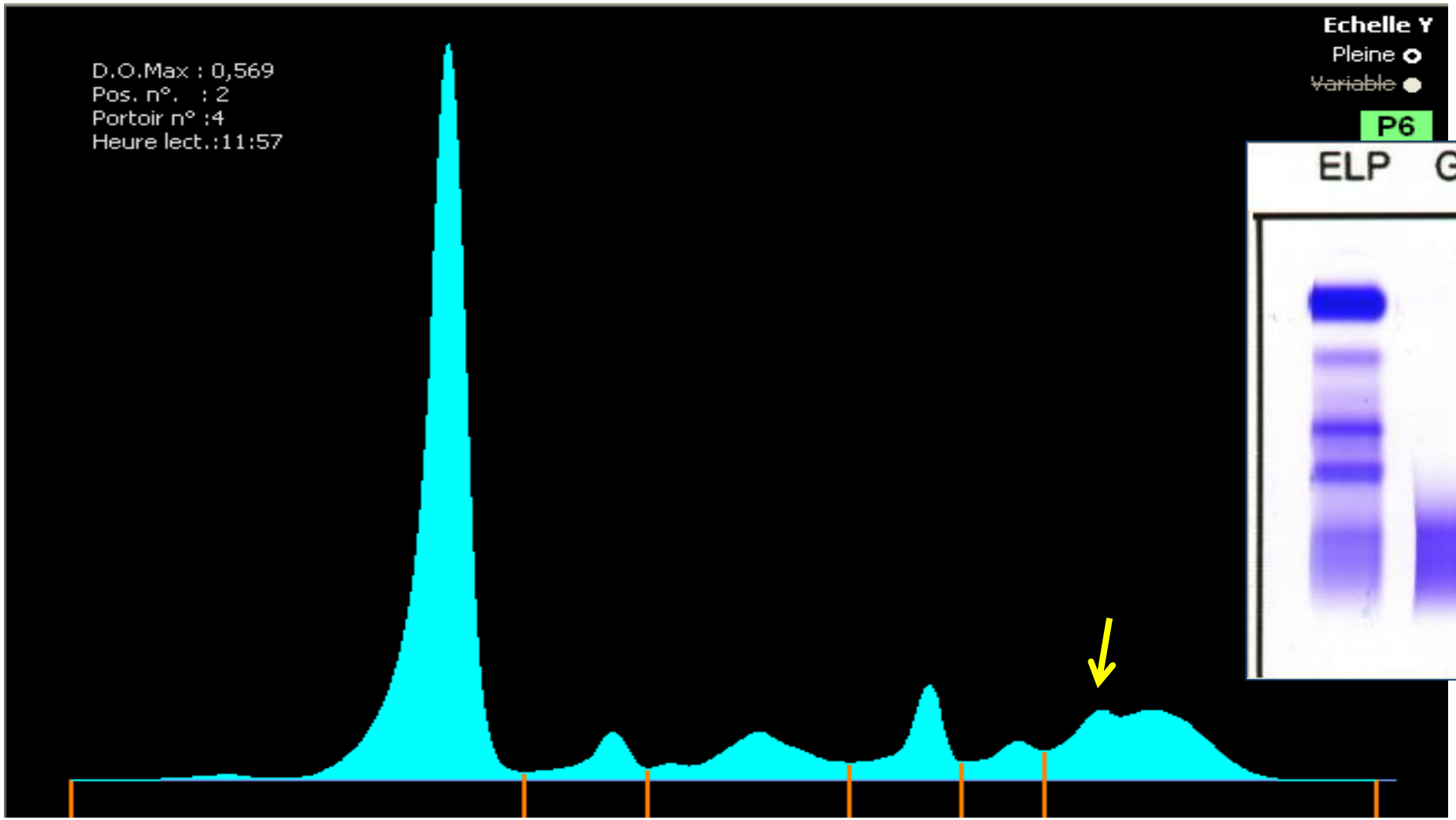
Inmunotipificación (IT) > Inmunofijación (IF)

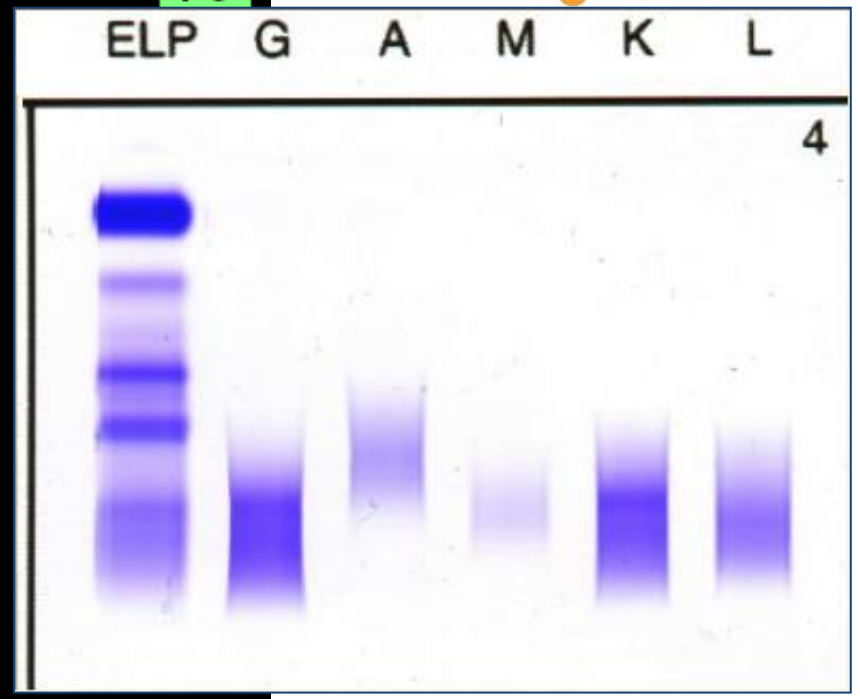




CM en presencia de un aumento policlonal

¿Es evidente el CM?

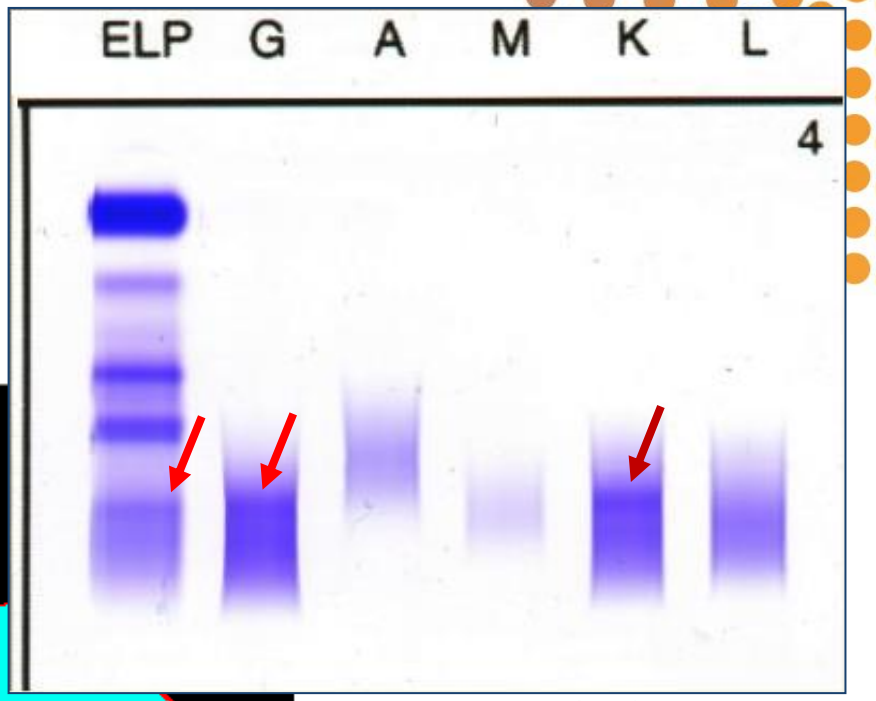


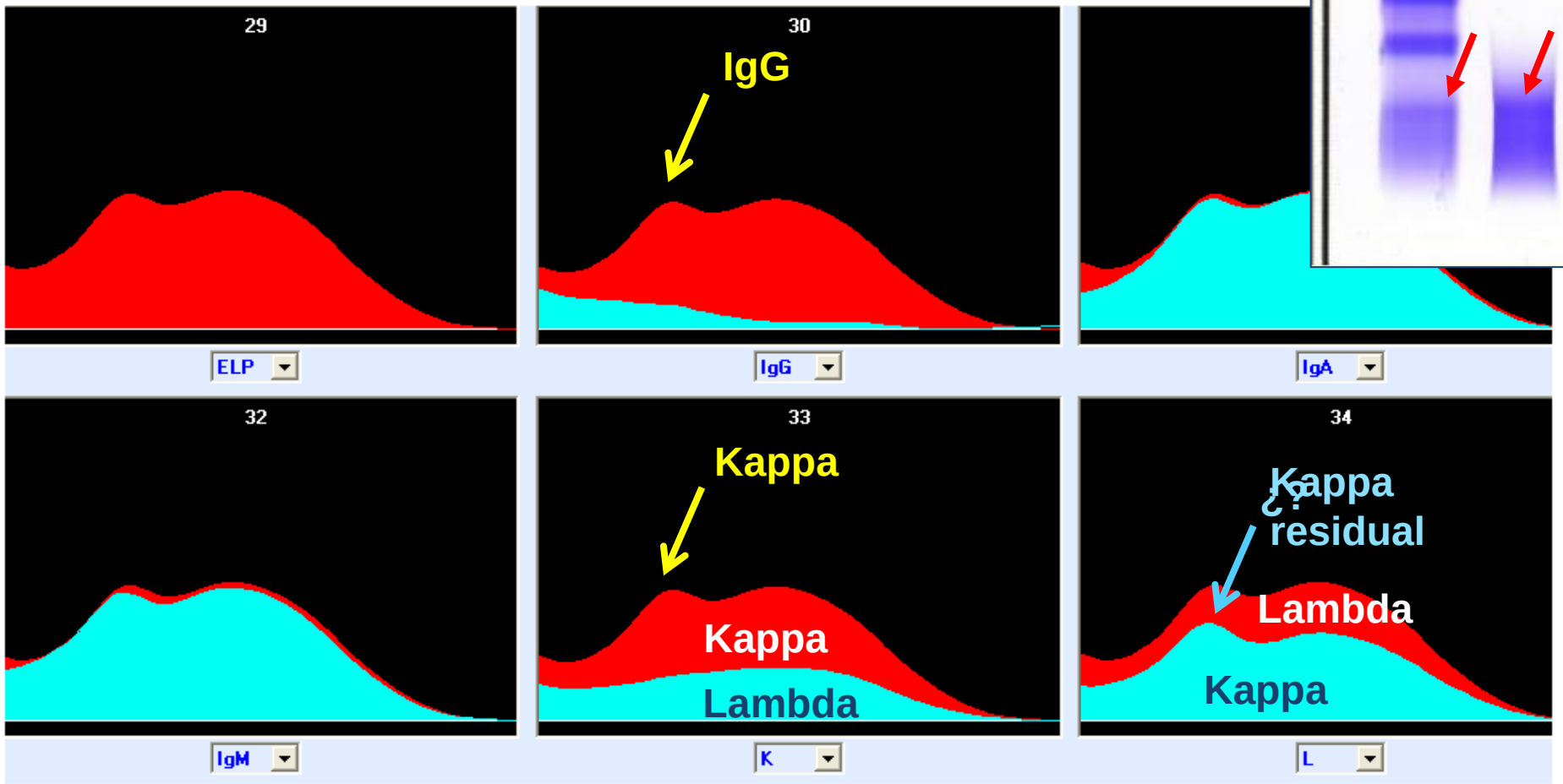


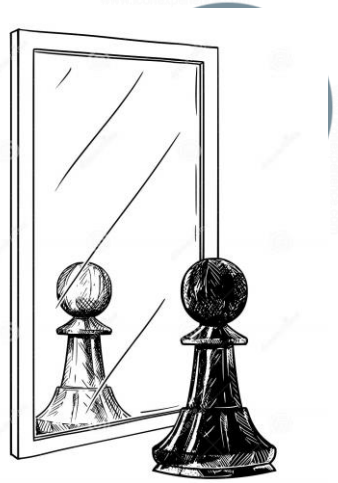
1 anormalidad en la electroforesis de proteínas que migran en fracción gamma

Tenue IgG kappa

MISMA CONCLUSIÓN EN AMBAS TÉCNICAS:
la visibilidad es mejor en IT, debido a la sustracción del fondo policlonal



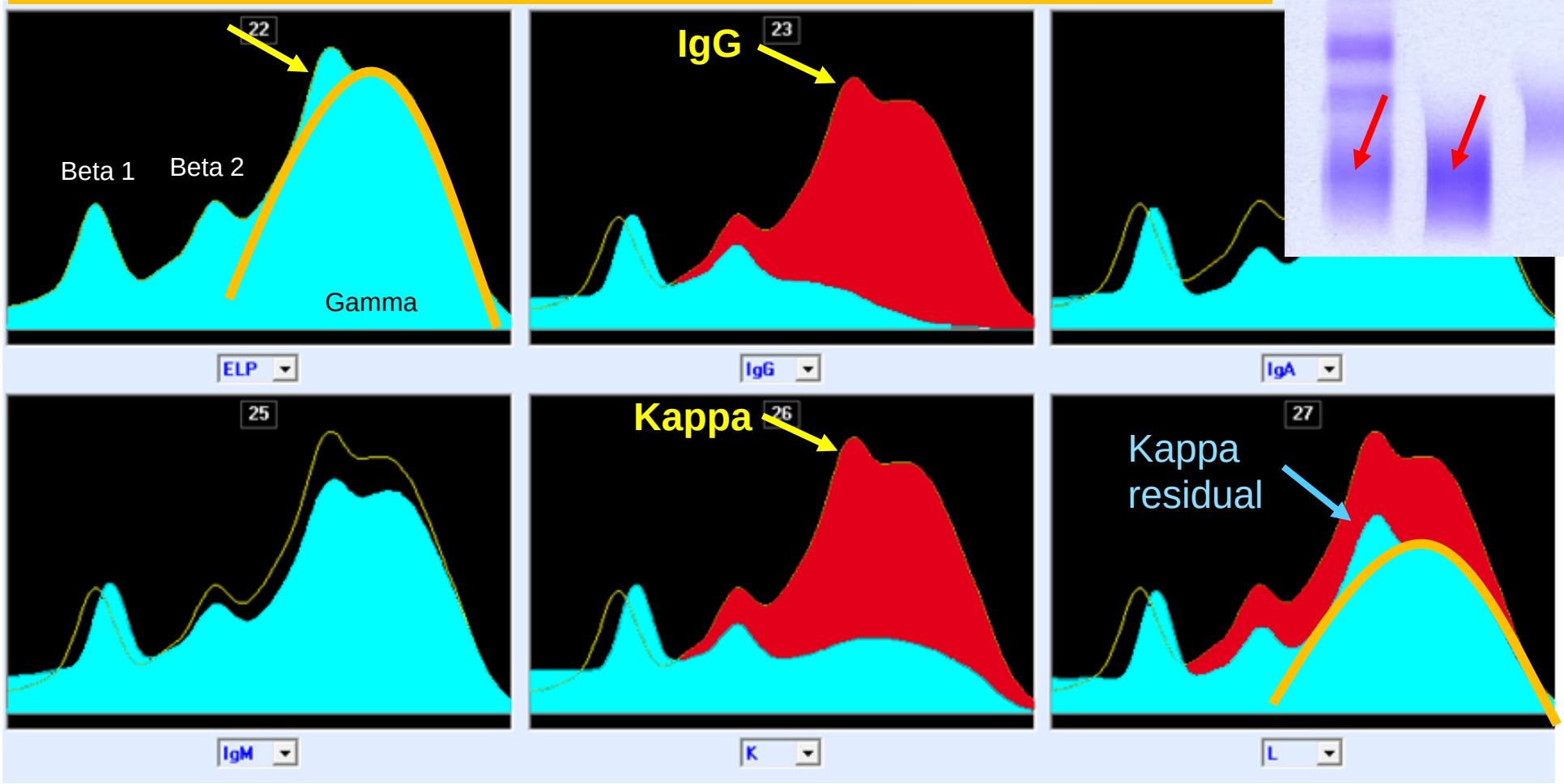


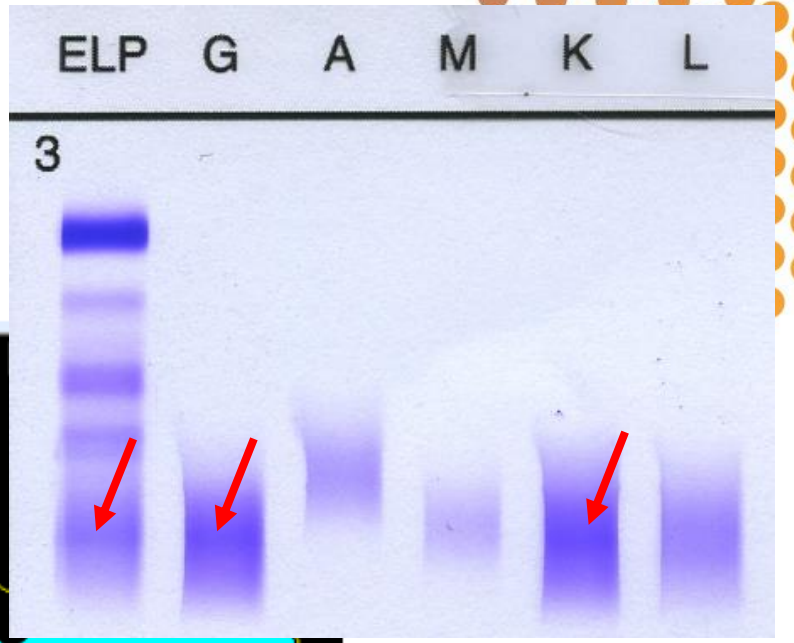


IgG Kappa

INTERPRETACIÓN MÁS FÁCIL EN IT:

En presencia de un fondo policlonal elevado la interpretación en IF se dificulta

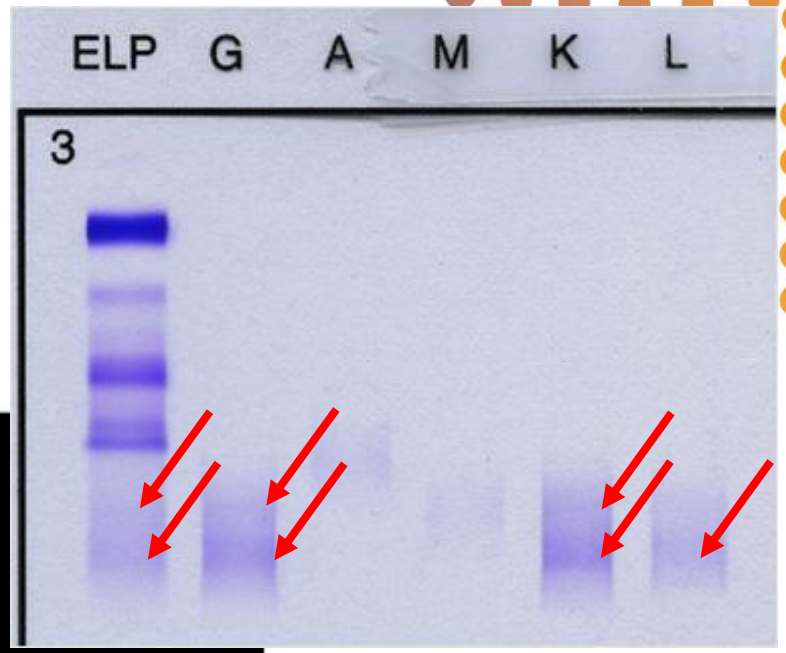


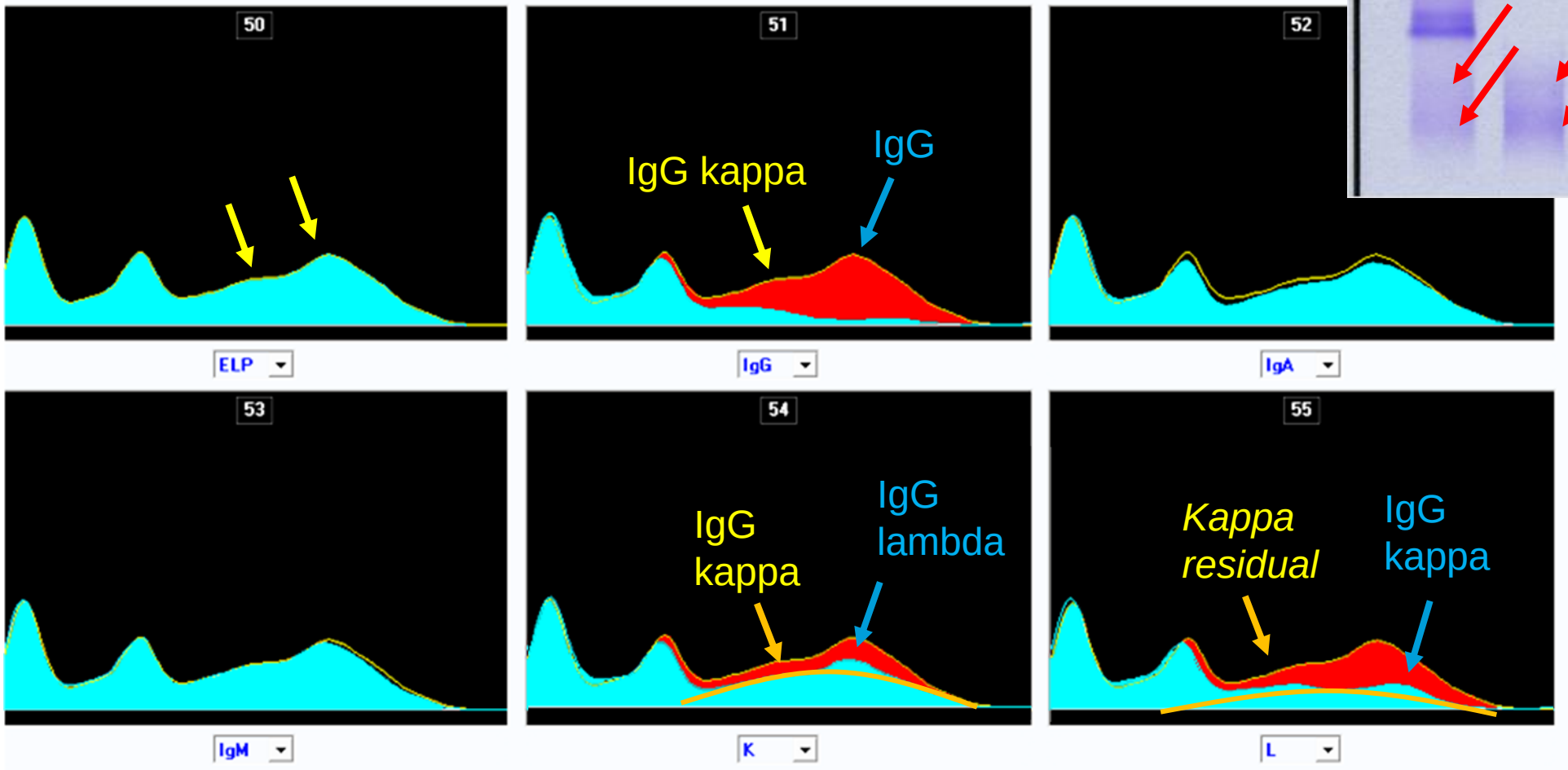


Interpretación de un perfil oligoclonal

Baja concentración de Inmunoglobulinas

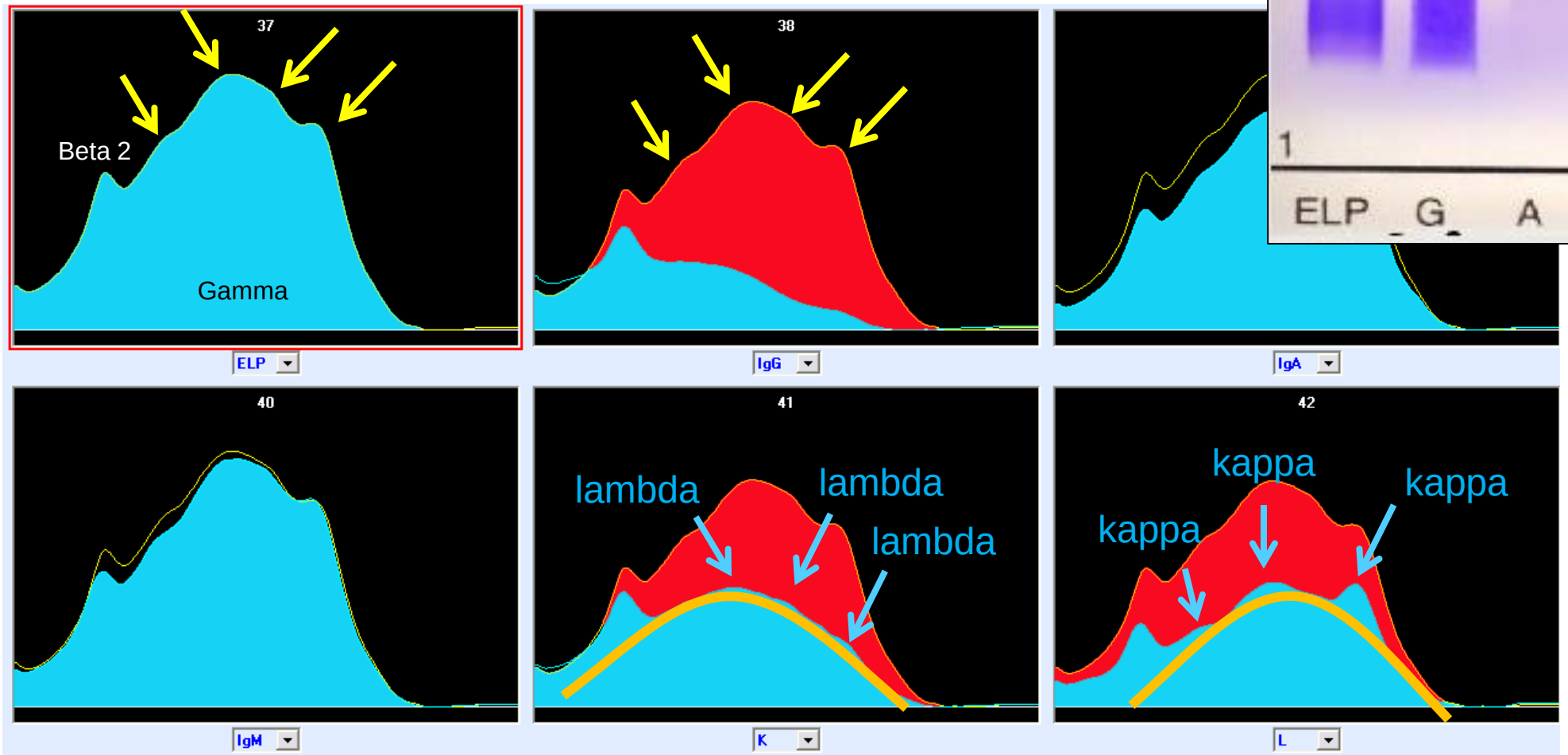
La presencia de 3 o más distorsiones en Kappa y/o Lambda en la IT identifica fácilmente a un perfil oligoclonal



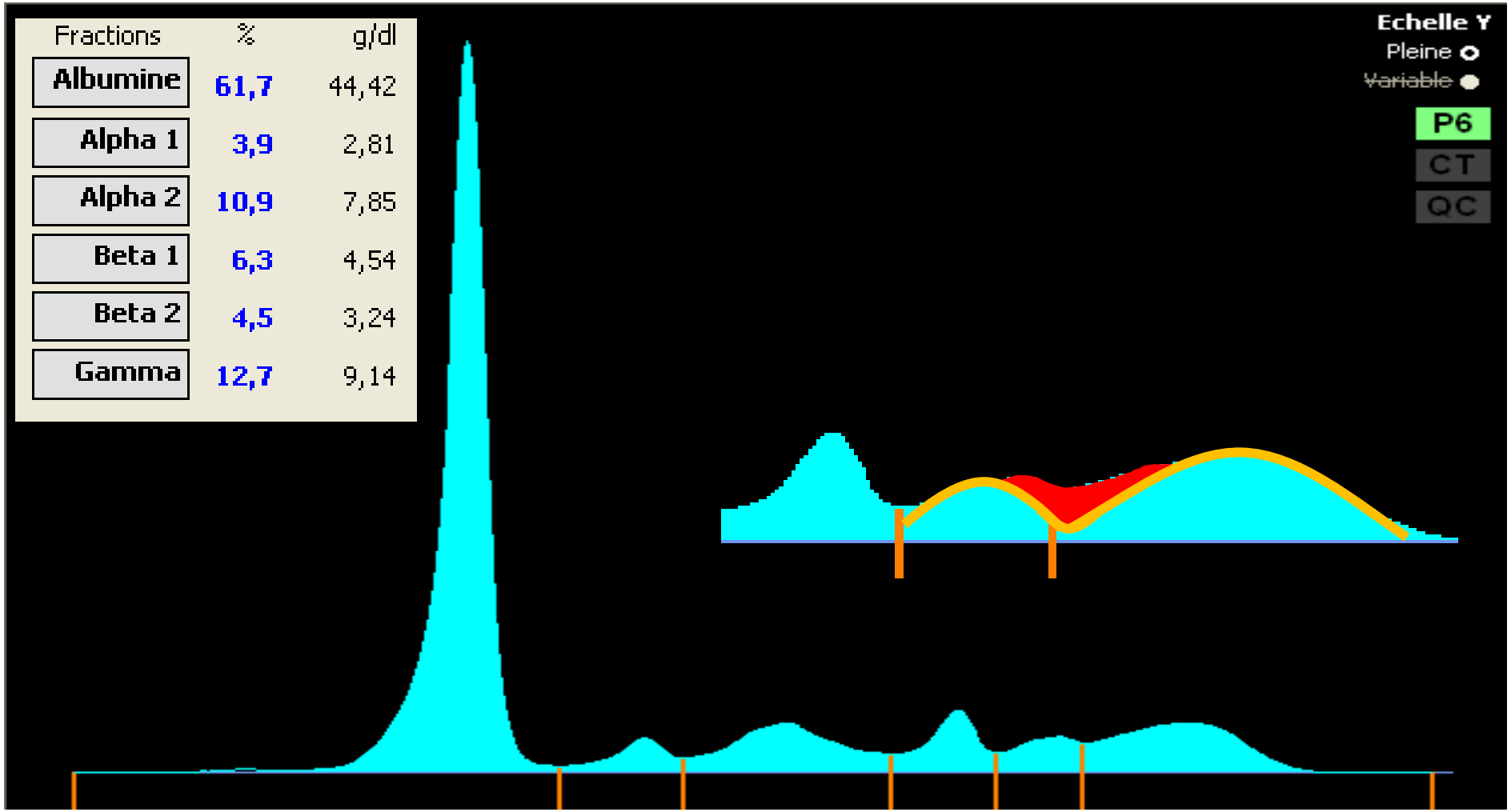


Perfil oligoclonal con incremento policlonal

INTERPRETACIÓN MÁS FÁCIL EN IT:
La interpretación del perfil oligoclonal es más fácil en IT en comparación a IF



Seguimiento del paciente Completa respuesta (CR)

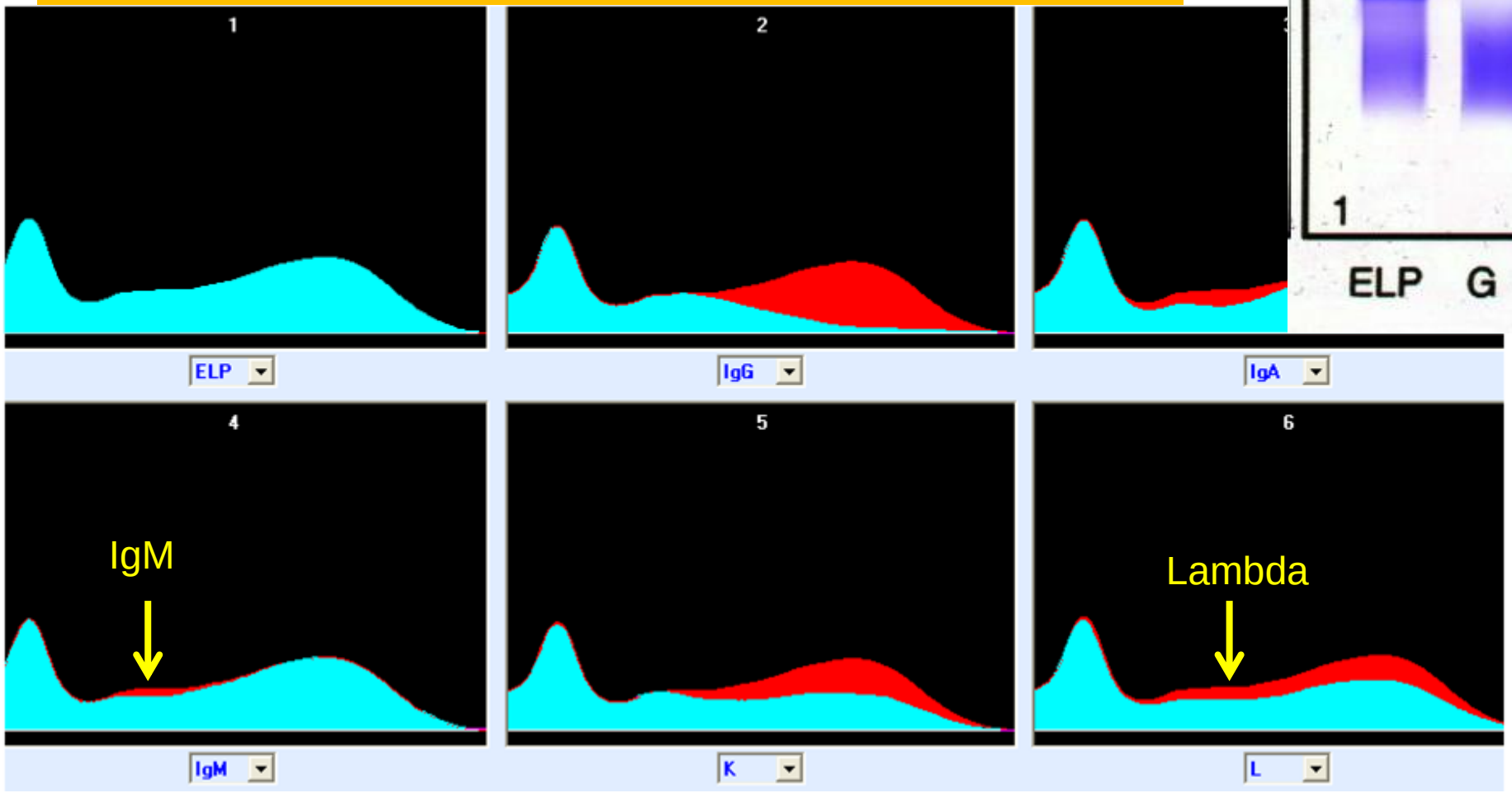


Discreta deformación del patron electroforético (beta 2)

Tenue IgM lambda

LA IF ES NECESARIA CUANDO:

- *La anormalidad no es evidente o existen dudas en el proteinograma y/o en la interpretación de la IT*
- *La capacitación contínua es clave en la correcta interpretación*



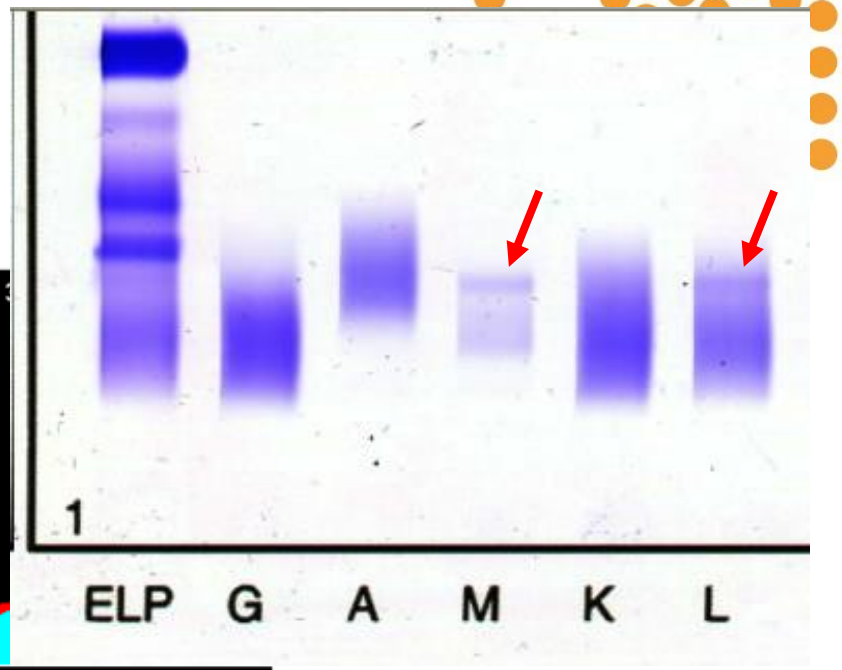


Table 4. 2011 response criteria

Response subcategory	Response criteria
Molecular CR	CR plus negative ASO-PCR, sensitivity 10^{-5}
Immunophenotypic CR	Stringent CR plus Absence of phenotypically aberrant PCs (clonal) in BM with a minimum of 1 million total BM cells analysed by multiparametric flow cytometry (with > 4 colours)
Stringent CR	CR as defined below plus Normal FLC ratio and
CR	Negative immunofixation on the serum and urine and Disappearance of any soft tissue plasmacytomas and ≤ 5% PCs in BM
VGPR	Serum and urine M protein detectable by immunofixation but not on electrophoresis or ≥ 90% reduction in serum M protein plus urine M protein level <100 mg per 24 h
	levels is required in place of the M protein criteria If serum and urine M protein are unmeasurable, and serum-free light assay is also unmeasurable, ≥ 50% reduction in PCs is
Progressive disease	Increase of 25% from lowest confirmed response value in one of the following criteria: Serum M protein (absolute increase must be ≥ 0.5 g/dL) Serum M protein increase ≥ 1 g/dL, if the lowest M component was ≥ 5 g/dL Urine M protein (absolute increase must be ≥ 200 mg/24 h)

ASO-PCR, allele-specific polymerase chain reaction; BM, bone marrow; CR, complete response; FLC, free light chain; M protein, monoclonal protein; PCs, plasma cells; PR, partial response; VGPR, very good partial response.
Adapted from [9] with permission of the American Society of Hematology; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

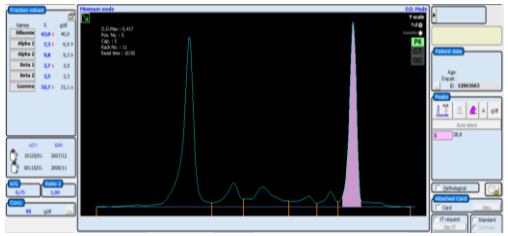
La IF es necesaria en el seguimiento del paciente

Seguimiento de pacientes con Mieloma Múltiple

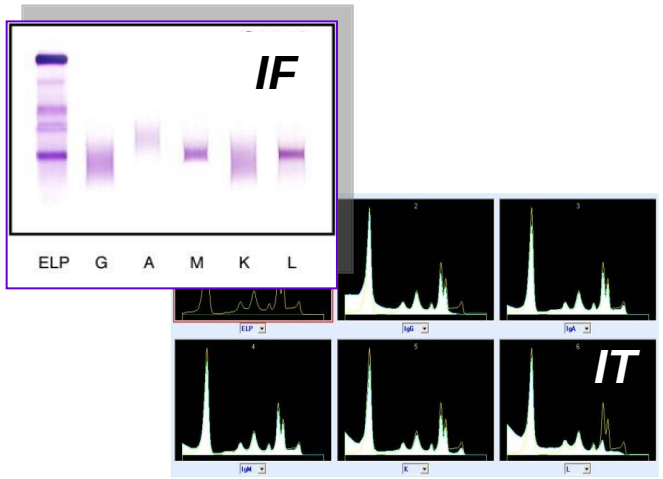
Diagnóstico

Seguimiento y evaluación de la respueta

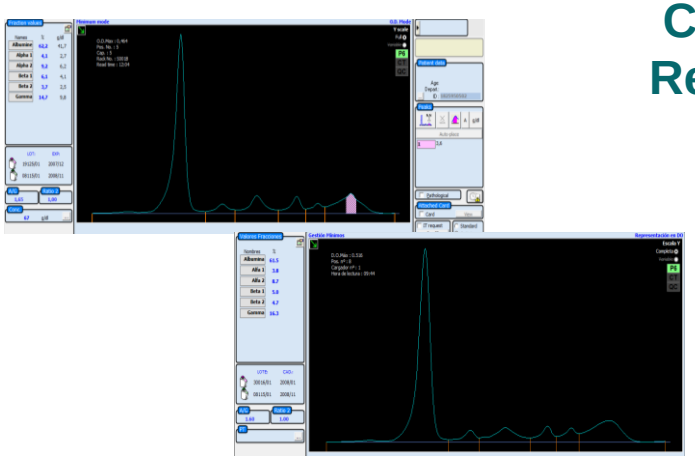
EPS +
Cuantificación del pico



+



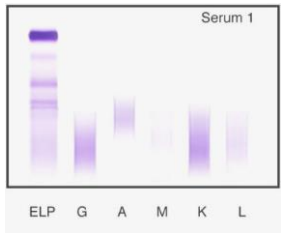
SPE +
Cuantificación del CM



Sin pico en SPE

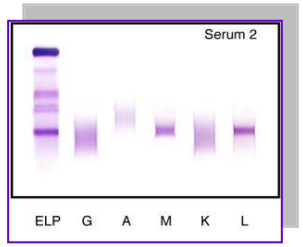
Inmunofijación (IF)

IF Negativa:
Complete Response



Relación K/L Normal (FLC)
Stringent complete Response

IF Positiva:
Very good partial Response



¿Es la IF mejor que la IT o son equiparables?

Estudios realizados

Amyloid
The Journal of Protein Folding Disorders
http://informahealthcare.com/amy
ISSN: 1350-6129 (print), 1744-2818 (electronic)
Amyloid, Early Online: 1–4
 DOI: 10.1080/13506129.2016.1232647
Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

ORIGINAL ARTICLE

Capillary electrophoresis/immunosubtraction as a better alternative to immunofixation for detecting and immunotyping serum monoclonal proteins in patients with immunoglobulin light chain (AL) amyloidosis

Kanji Miyazaki and Kenshi Suzuki

t6.3 Electrophoretic Patterns Associated with Monoclonal Gammopathies

Condition	Typical Serum Electrophoretic Pattern
I. Multiple myeloma	
II. Waldenström macroglobulinemia	
III. B-lymphoproliferative disorders	
IV. AL amyloidosis	
V. Monoclonal gammopathy with other clinical condition	
VI. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS)	Small γ spike

50 Pacientes con amiloidosis:

- 17 – Recién diagnosticado (Mayormente pequeñas bandas)
- 33 – Siendo tratado (bandas más pequeñas)

Resultados

Table 1. Diagnostic sensitivity of capillary immunosubtraction and others.

Type of examination	Newly diagnosed AL amyloidosis patients ($n = 17$) Positive (no.)	% (95% CI)	AL amyloidosis patient undergoing treatment ($n = 33$) Positive (no.)	% (95% CI)
sIFE	7	41% (15–67)	8	24% (9–40)
CE/IS	7	41% (15–67)	9	27% (11–43)
SPEP (M peak)	7	41% (15–67)	3	9% (0–19)
FLC (abnormal)	15	88% (71–100)	11	33% (16–50)
sIFE + FLC	17	100%	14	42% (25–60)
CE/IS + FLC	17	100%	16	48% (30–66)

sIFE, serum immunofixation electrophoresis; CE/IS, capillary electrophoresis/immunosubtraction; SPEP, serum protein electrophoresis; FLC, free light chain.

Análisis de resultados

1) *La IT es más sensible que IFE*
2) *Se requiere capacitación y experiencia para la interpretación precisa de IT*
3) *La IT detecta bandas oligoclonales con relativa facilidad que la IFE*

DE GRUYTER Clin Chem Lab Med 2020; 58(4): 457–459

Editorial

Mario Plebani

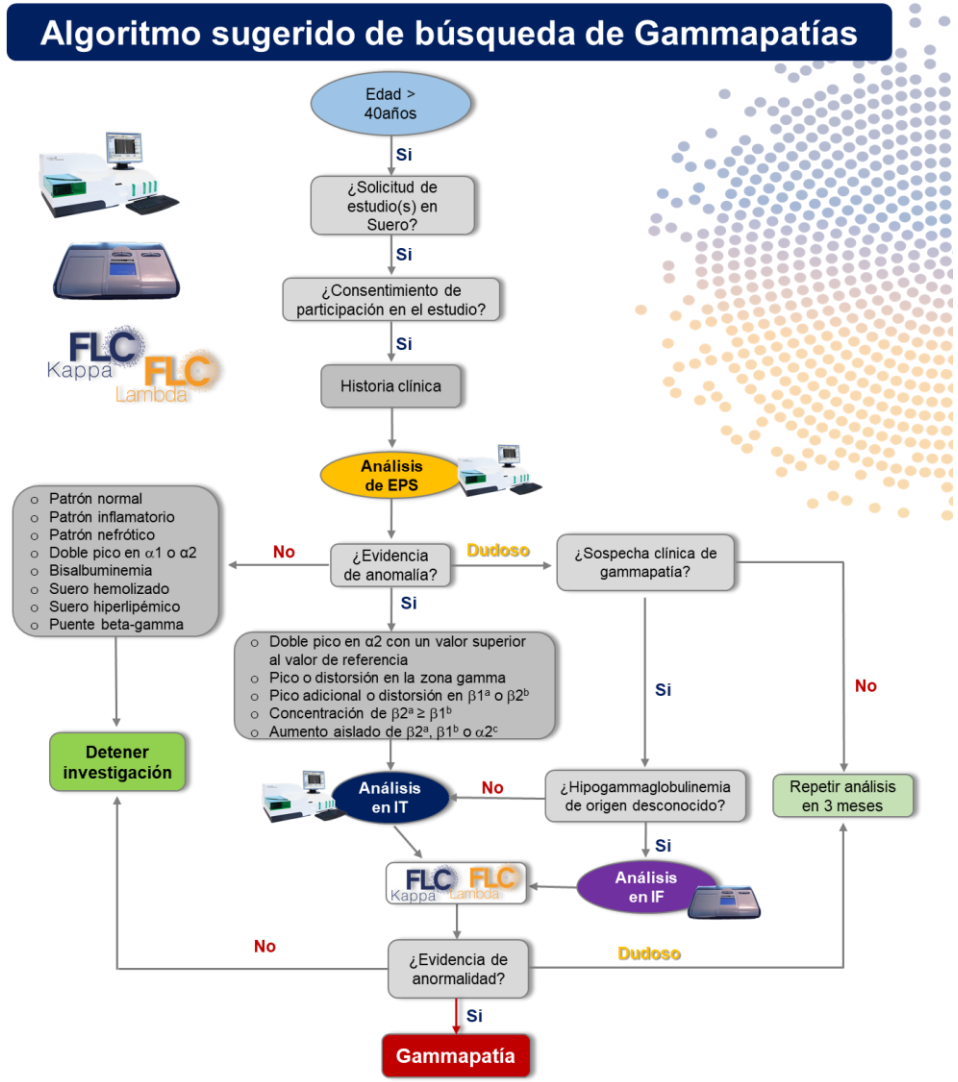
New insights on the analytical performances for detecting and quantifying monoclonal proteins

The study has several merits: first of all a large number of centers were involved (14 clinical laboratories and two IVD companies across three continents) thus allowing to include results from the vast majority of technologies and methods available in the market; second, it has a sound basis of accuracy using samples spiked with a determined amount of monoclonal therapeutic antibodies with different migration patterns (cathodal, center gamma and beta) mimicking the presence of M-proteins in the serum; third, the tested samples show a wide range of M-protein concentrations (from 10 to 0.1 g/L) covering the range of concentrations encountered in the clinical laboratory routine and including a high number of samples with low concentrations of the M-protein; fourth, the amount of sera in the samples was enough to allow duplicated measurements (1203 in total) so that it was possible to determine the within-laboratory precision.

most important consideration derived from the study is that quantifying and reporting M-proteins below 1 g/L is affected by an unacceptable loss of accuracy: these should be reported qualitatively. However, the laboratory professionals should be aware that this value could be much higher as the polyclonal background increases and the M-proteins migrate in the mid-gamma zone or overlap other proteins normally present in the electrophoretic patterns.

Regarding the LoD, (examined in Part II) the results of the study show small but significant differences between different methods. All the tested methods are able to detect M-proteins till a concentration of 1 g/L; this value further decreases (around 0.5 g/L) if capillary technology was used and if the M-protein is included in a hypogamma background. As expected, the typing methods (immunofixation and immunosubtraction) can detect M-proteins at lower concentrations, with immunofixation showing the

Estudio de prevalencia de Gammapatías monoclonales



a - En ausencia de anemia por deficiencia de hierro o hemólisis
b - En ausencia de inflamación (C3, C4), daño hepático (Ig A policlonal) y plasma (presencia de fibrinógeno)
c - En ausencia de inflamación, síndrome nefrótico o hemólisis

Objetivo: Incrementar la prescripción en la población general >40yo para evitar el diagnóstico en etapas tardías de la enfermedad

n = 9.000 pacientes sin diagnóstico de gammapatía monoclonal

Estudio en asociación con la Fundación Internacional de Mieloma (LATAM)

País: Uruguay

Conclusiones

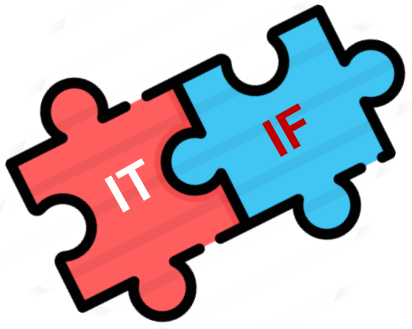
Puntos clave

Comparación IF e IT

Característica	IF	IT
Metodología	Electroforesis en Gel de agarosa	Electroforesis Capilar
Automatizado	No	**Automatización real**
Cadenas pesadas	IgG, IgA, IgM, **IgD e IgE**	IgG, IgA, IgM
Cadenas Ligeras Totales (Kappa y Lambda)	Si	Si
Cadenas Ligeras Libres (Kappa y Lambda)	**Si**	No
Sensibilidad	**Excelente sensibilidad** (12-25 mg/dL)	**Misma sensibilidad que la Electroforesis de proteínas** (13–31 mg/dL) **Mejor opción para pacientes con Amiloidosis**
Resolución	Menor resolución	**Mayor Resolución** CM de migración próxima Perfiles Oligoclonales En incremento del fondo policlonal

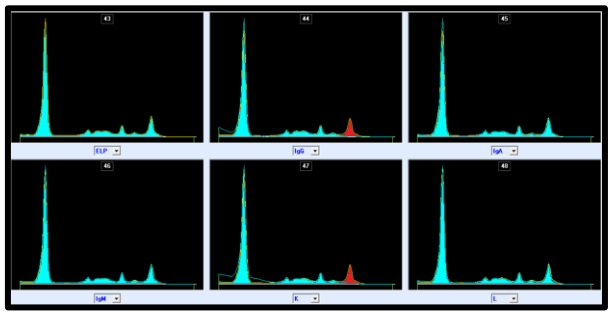
Comparación IT e IF

Característica	IF	IT
Detección del CM	Colorante	**Automatica a 200 nm**
Transferencia automática de resultados	No (El gel debe ser escaneado)	**Si**
Rendimiento	Hasta 6 pruebas/hr	**Hasta 12 pruebas/hr**
Útil en el **diagnóstico** del paciente	Si	Si
Útil en el **seguimiento** del paciente	**Si** **para confirmar la respuesta completa (CR)**	Si
Útil en terapias con anticuerpos monoclonales	**Yes** **Hydrasys-Daratumumab o Hydrasys-Isatuximab**	No



IT e IF son técnicas complementarias

Muchas gracias por su atención



Inmunotipado (IT):
Real automatización en la caracterización del componente monoclonal

Ruben Doroteo Alvillar

Market Development Manager LATAM

Gerente de Desarrollo de Mercado LATAM

rdoroteo@sebia.com