



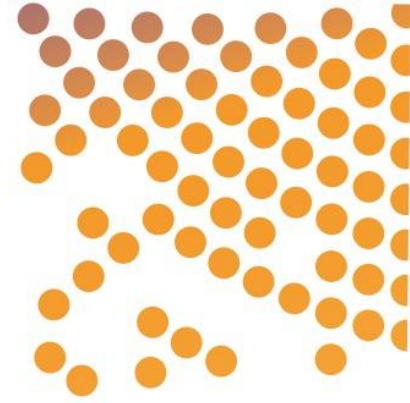
IMMUNOTYPING

Nieves SANZ

Asesora Científica - SEBIA LATAM

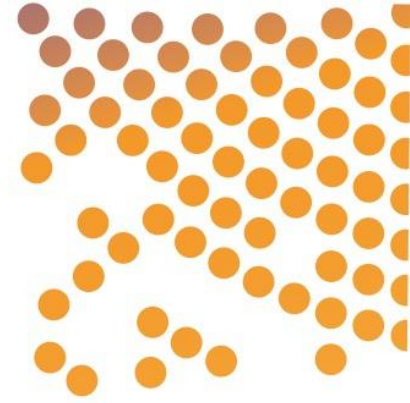
nsanz@sebia.com

Programa



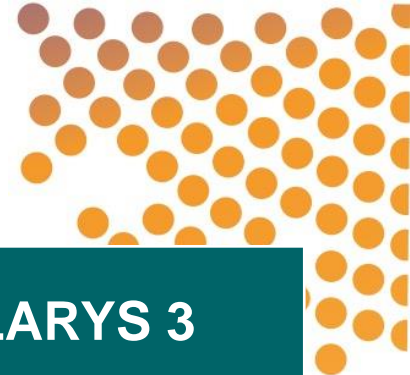
- ¿Qué es el Immunotyping ?
- ¿Qué necesito para realizar la técnica de Immunotyping ?
- Principio de la técnica
- ¿Cuándo realizar un Immunotyping ?
- Opciones de dilución de la muestras
- Recomendaciones para la interpretación de resultados
- Interpretación de resultados y Casos enviados por los usuarios de IT en LATAM

¿Qué es el Immunotyping?



- **IMMUNOTYPING = INMUNOTIPADO = INMUNOTIPIFICACION**
- El Immunotyping (IT) permite la detección y caracterización de las proteínas monoclonales en suero y orina, mediante electroforesis capilar.
- Cada muestra que se analiza se mezcla con antisueros de diferentes especificidades:
 - anti-cadenas pesadas: IgG, IgA e IgM
 - y anti-cadenas ligeras: kappa y lambda
- Automatización completa del análisis y de trazabilidad

¿Qué se necesita para realizar la técnica ?

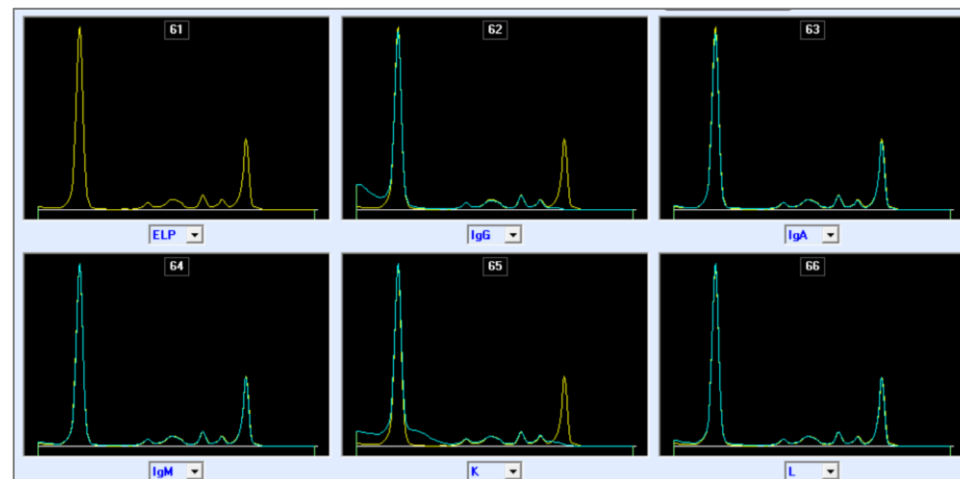
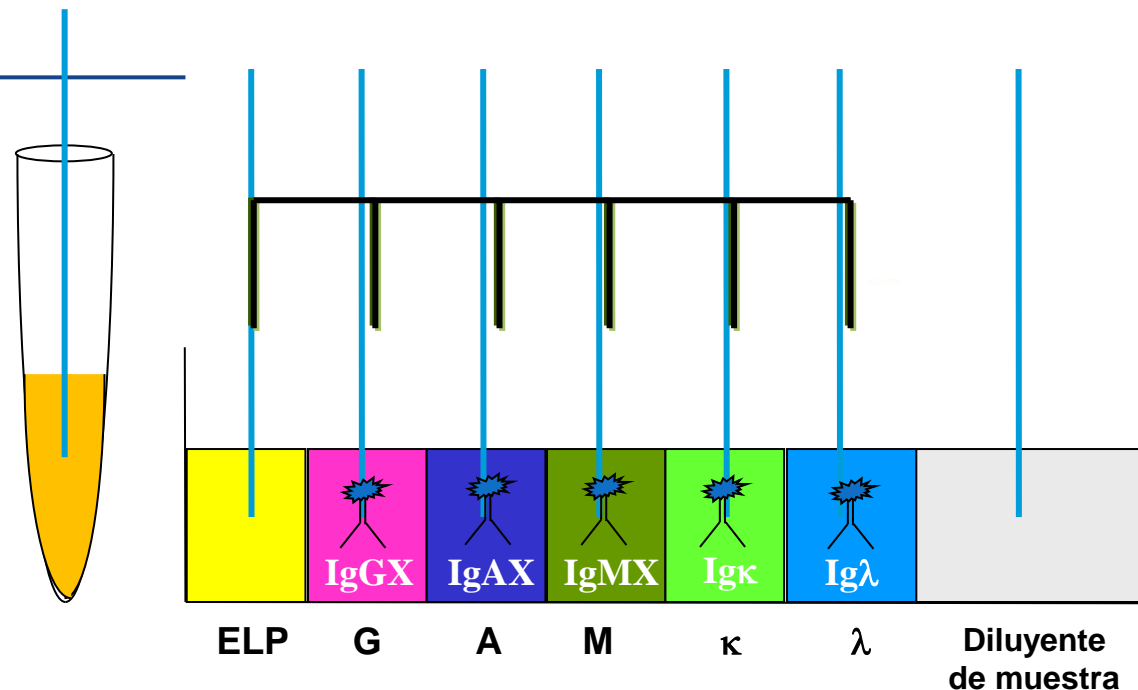


	MINICAP FLEX PIERCING	CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING	CAPILLARYS 3
			
KIT PROTEIN(E) 6	2203	2003	2503
KIT IMMUNOTYPING	2300	2100	2600
			
Cadencia	2 resultados/hora	8 resultados/hora	OCTA: 10 resultados/hora TERA: 13 resultados/hora

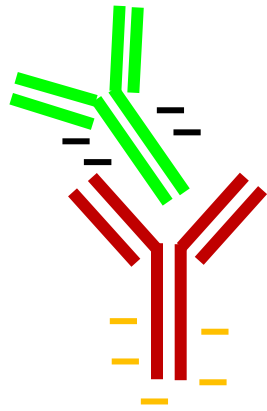
Principio de la técnica

- El **Immunotyping** se realiza en cuatro etapas:

1. Dilución de la muestra con un diluyente específico. *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. Inyección de las muestras, seguida de la separación electroforética de las proteínas y la detección directa de las proteínas a 200 nm.
4. Superposición del perfil de referencia (ELP) con los perfiles de los antisueros (Ig G, Ig A, Ig M, Kappa y Lambda), lo que permite la tipificación de la proteína monoclonal.



Principio de la técnica



Inmunoglobulina
del suero



Antisuero

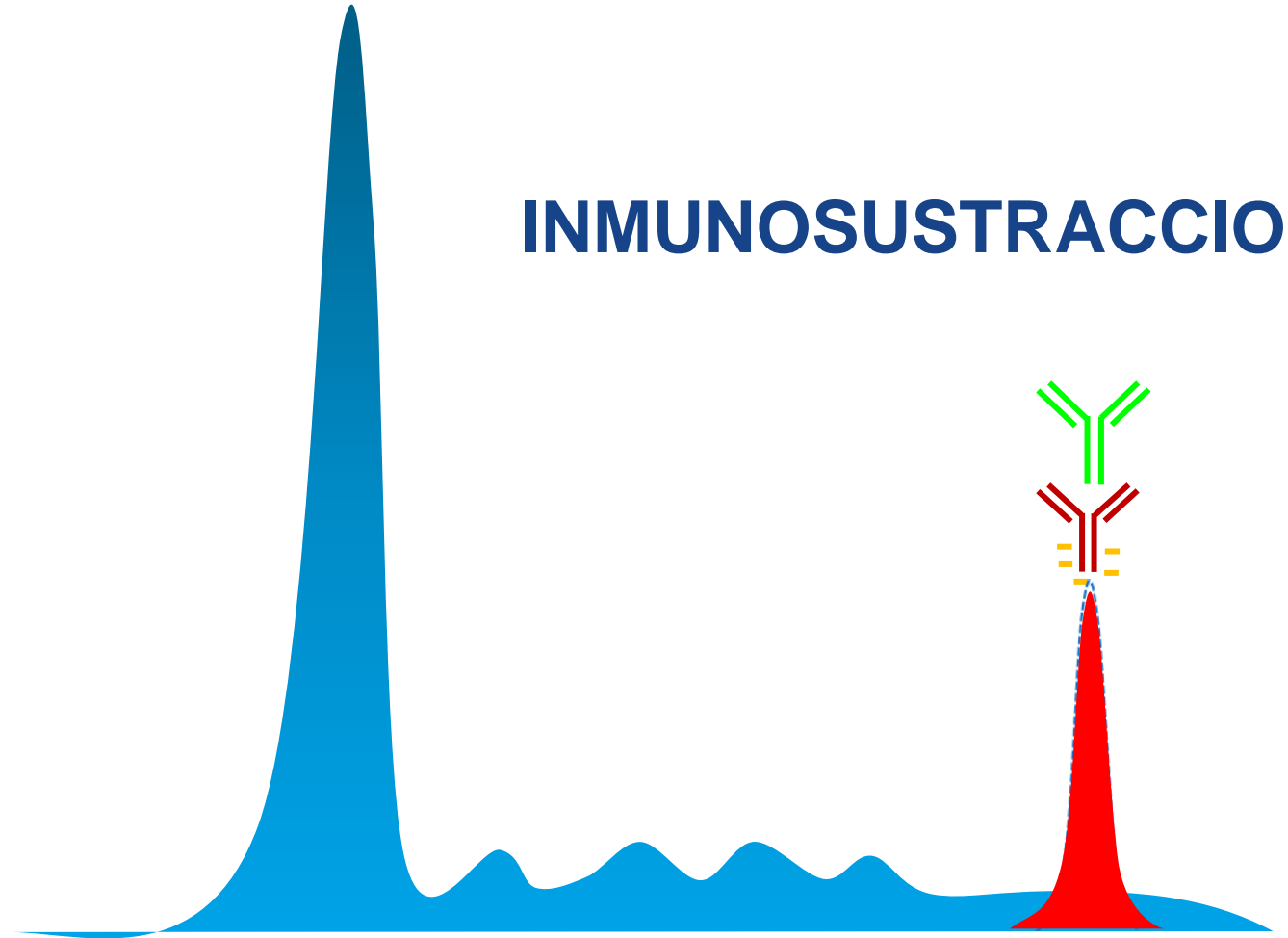


INMUNOCOMPLEJO
con elevada carga negativa

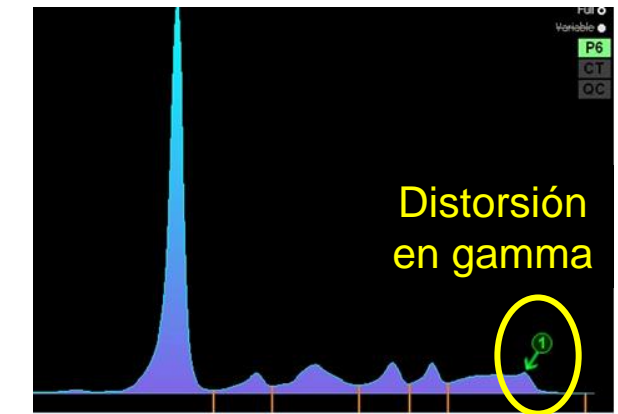
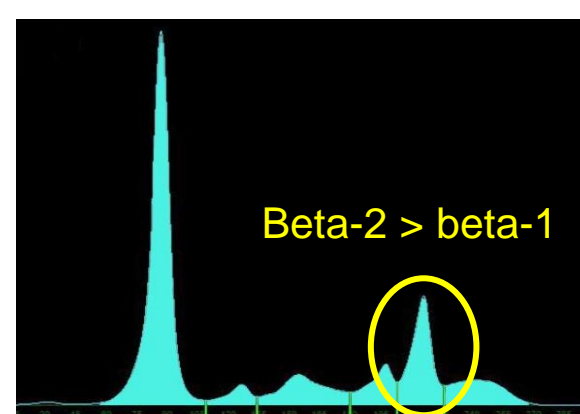
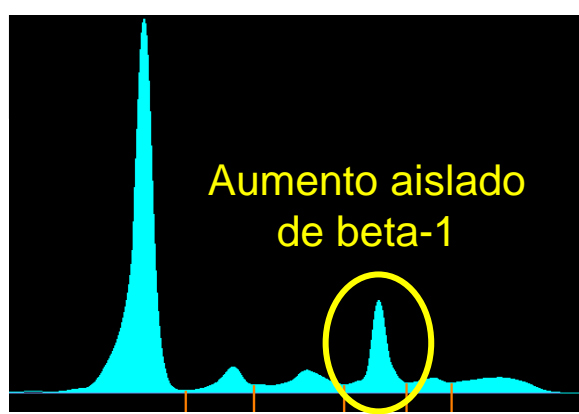
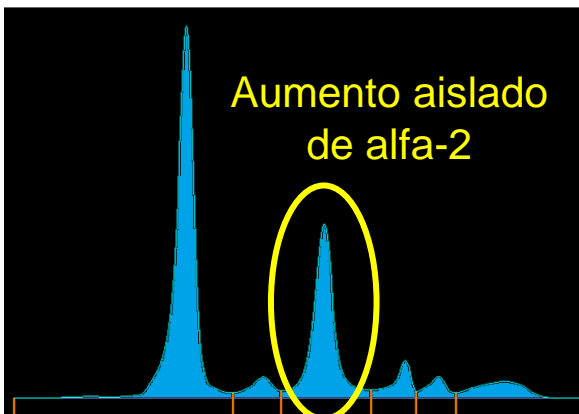
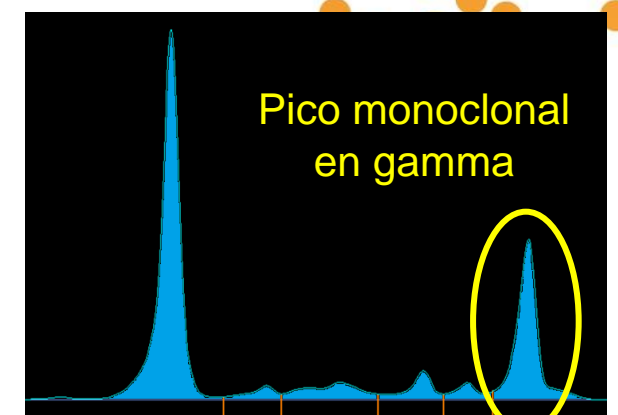
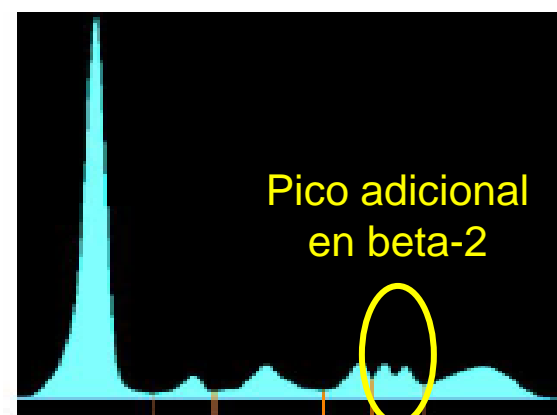
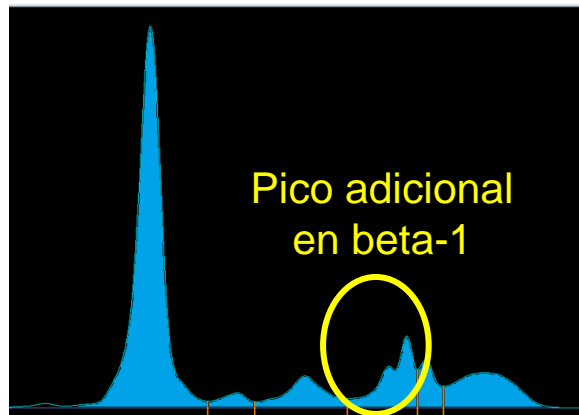
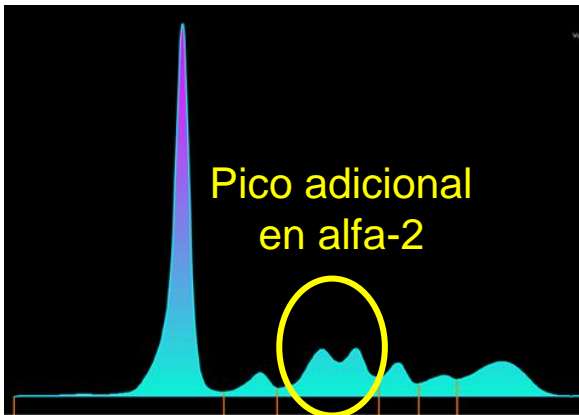
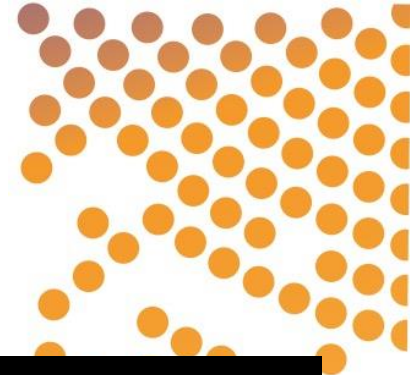


Migración del
INMUNOCOMPLEJO cercano
a la fracción albúmina

INMUNOSUSTRACCION

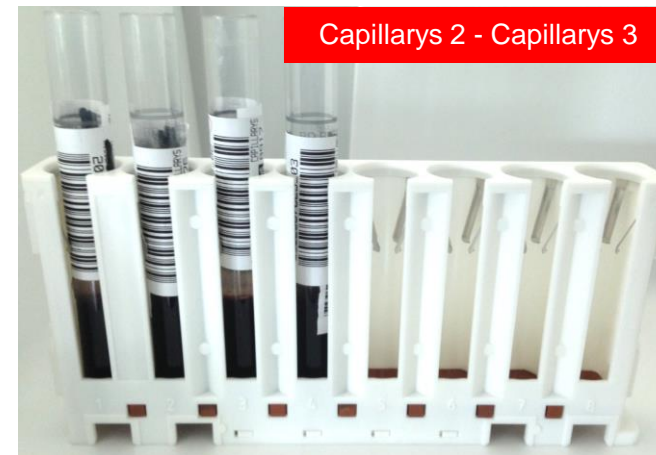


¿Cuándo realizar un Immunotyping?



Análisis de las muestras

- El análisis se realiza con sueros frescos
- Las muestras pueden ser conservadas:
 - Hasta 10 días entre 2 y 8 °C
 - Hasta 3 meses entre - 18 / - 30 °C
- Use directamente muestras de suero sin diluir
- Muestreo desde el tubo primario
- Volumen mínimo de muestra:
 - Tubo primario : 250 µL
 - Tubo eppendorf: 150 µL





OPCIONES DE DILUCION DE LAS MUESTRAS

Opciones de dilución

Valores Fracciones

Nombres	%	g/l
Albumina	53,6 <	35,4 <
Alfa 1	5,6 >	3,7 >
Alfa 2	14,6 >	9,6 >
Beta 1	6,2	4,1
Beta 2	4,8	3,2
Gamma	15,2	10,0

Gestión Mínimos

D.O.Máx : 0,359
Pos. nº : 8
Cap. : 8
Cargador nº : 3
Hora de lectura : 11:38

Selección de dilución

- Hipogamma
- Estándar
- Hipergamma
- Optimizada

Pico monoclonal en gamma

Valores adicionales:
A/G: 1,16
Ratio 2: 1,00
PT: 66 g/l

Panel de control:
Escala Y: Completa
Variable: P6
Datos del paciente: ID: I0143615801
Ficha Detallada: Petición IT

Opciones de dilución



La elección de la dilución depende de la concentración total de inmunoglobulinas presentes en la muestra:

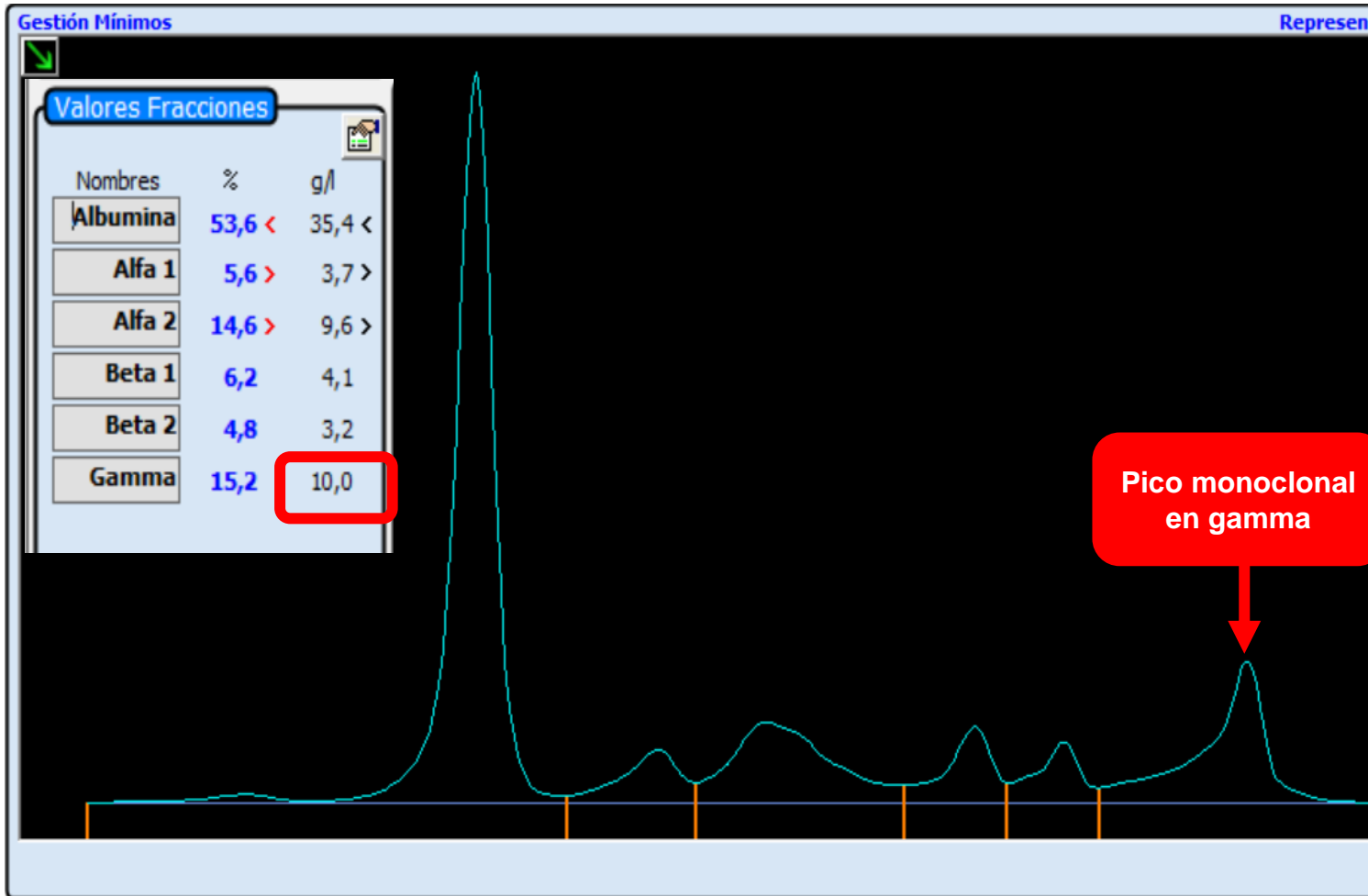
OPCIONES DE DILUCION

Hipogamma Ig < 8 g/L

Estándar Ig 8-20 g/L

Hipergamma Ig > 20 g/L

Selección del tipo de dilución



Concentración total de Ig = 10 g/L

OPCIONES DE DILUCION

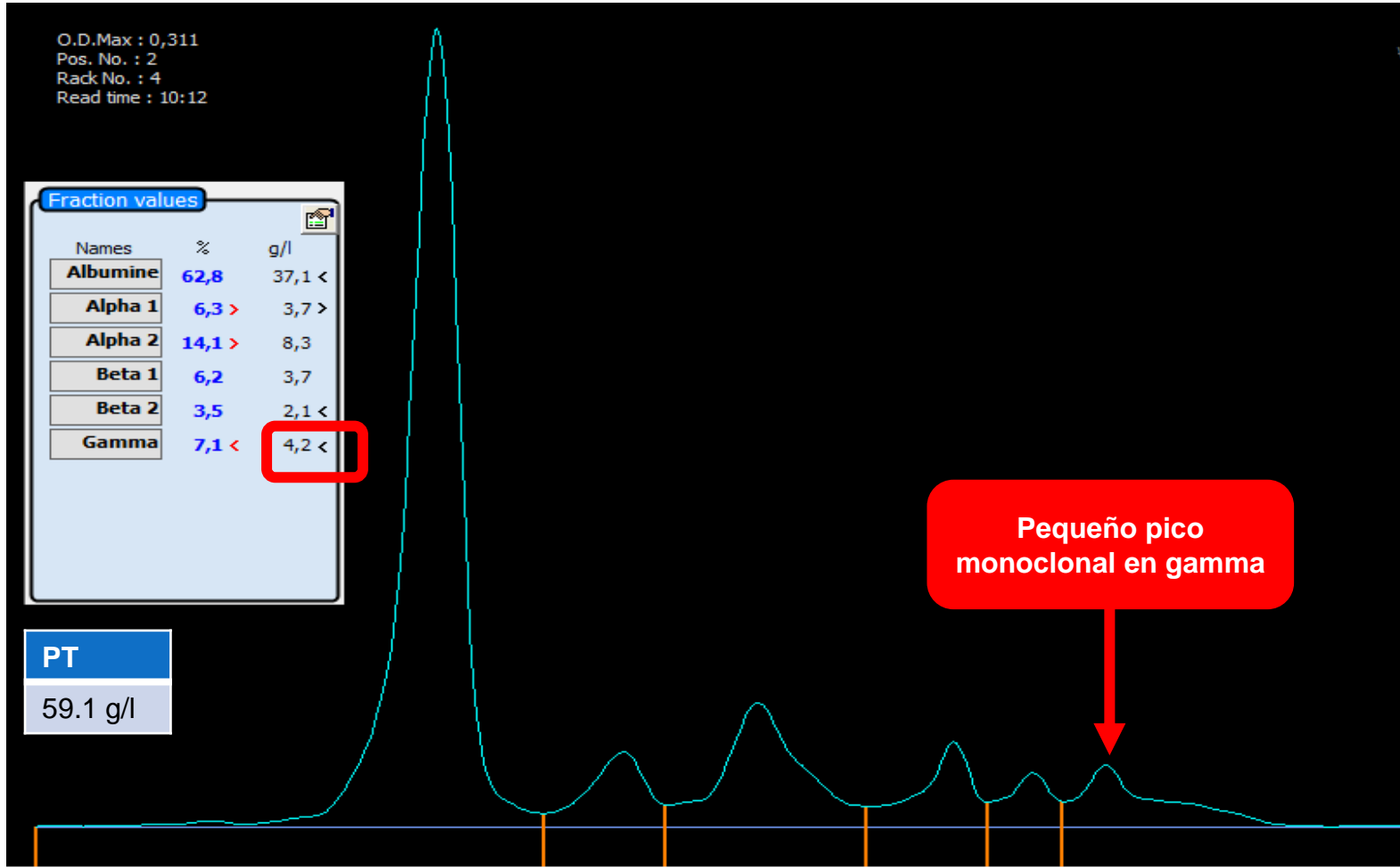
Hipogamma Ig < 8 g/L

Estándar Ig 8-20 g/L

Hipergamma Ig > 20 g/L

DILUCION ESTANDAR

Selección del tipo de dilución



Concentración total de Ig = 4,2 g/L

OPCIONES DE DILUCION

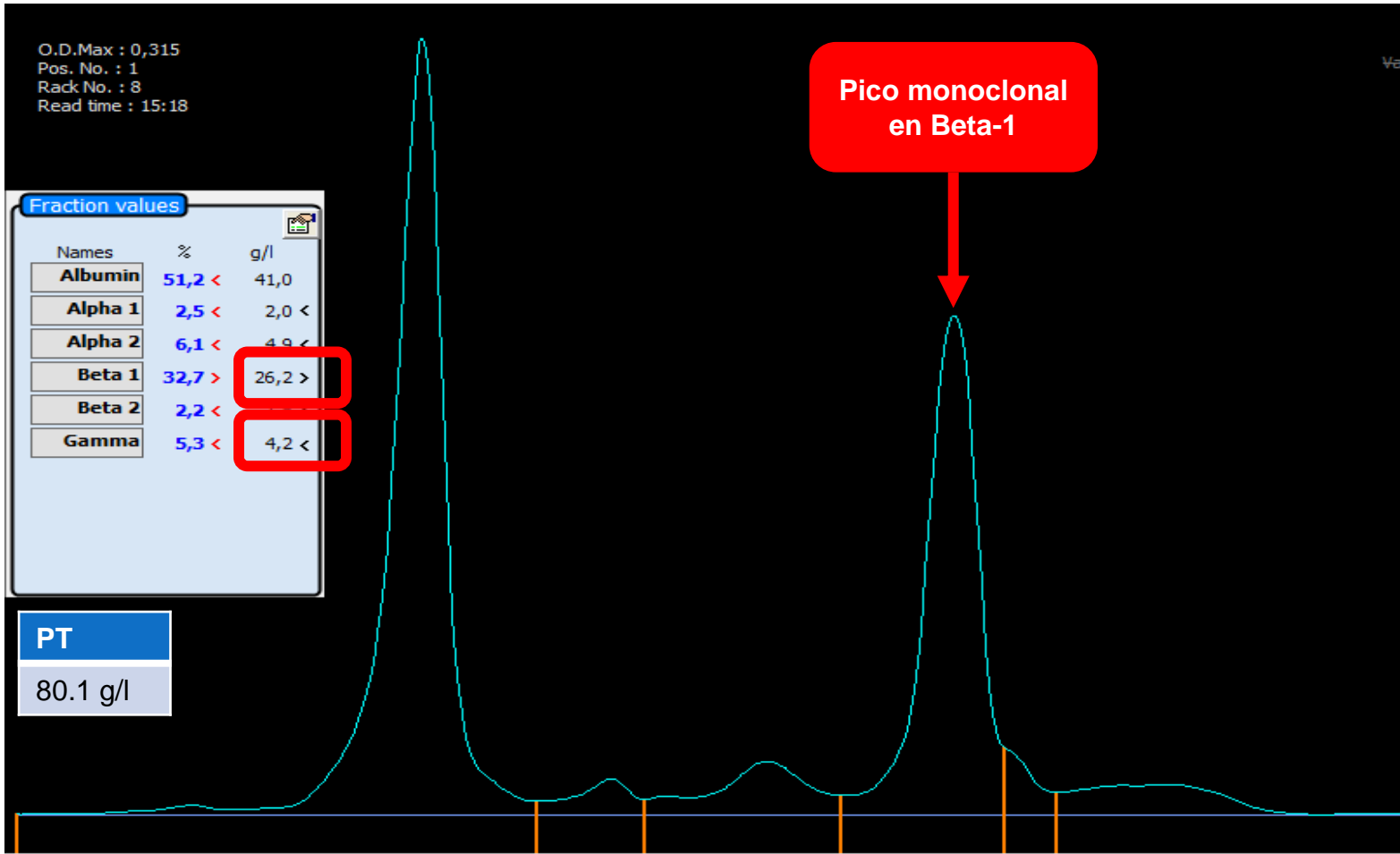
Hipogamma Ig < 8 g/L

Estándar Ig 8-20 g/L

Hipergamma Ig > 20 g/L

DILUCION HIPOGAMMA

Selección del tipo de dilución



Concentración total de Ig = 30,4 g/L

OPCIONES DE DILUCION

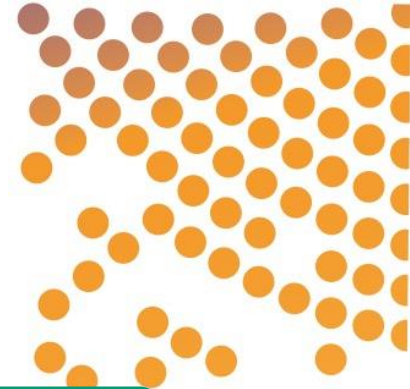
Hipogamma Ig < 8 g/L

Estándar Ig 8-20 g/L

Hipergamma Ig > 20 g/L

DILUCION HIPERGAMMA

Errores en la elección de la dilución



DILUCION MAS BAJA

No habrá suficiente ANTISUERO
para formar los inmunocomplejos



SUSTRACCION INCOMPLETA



DILUCION MAS ALTA

No habrá suficiente ANTIGENO
para formar los inmunocomplejos



Falta de visibilidad de pequeñas
anormalidades monoclonales

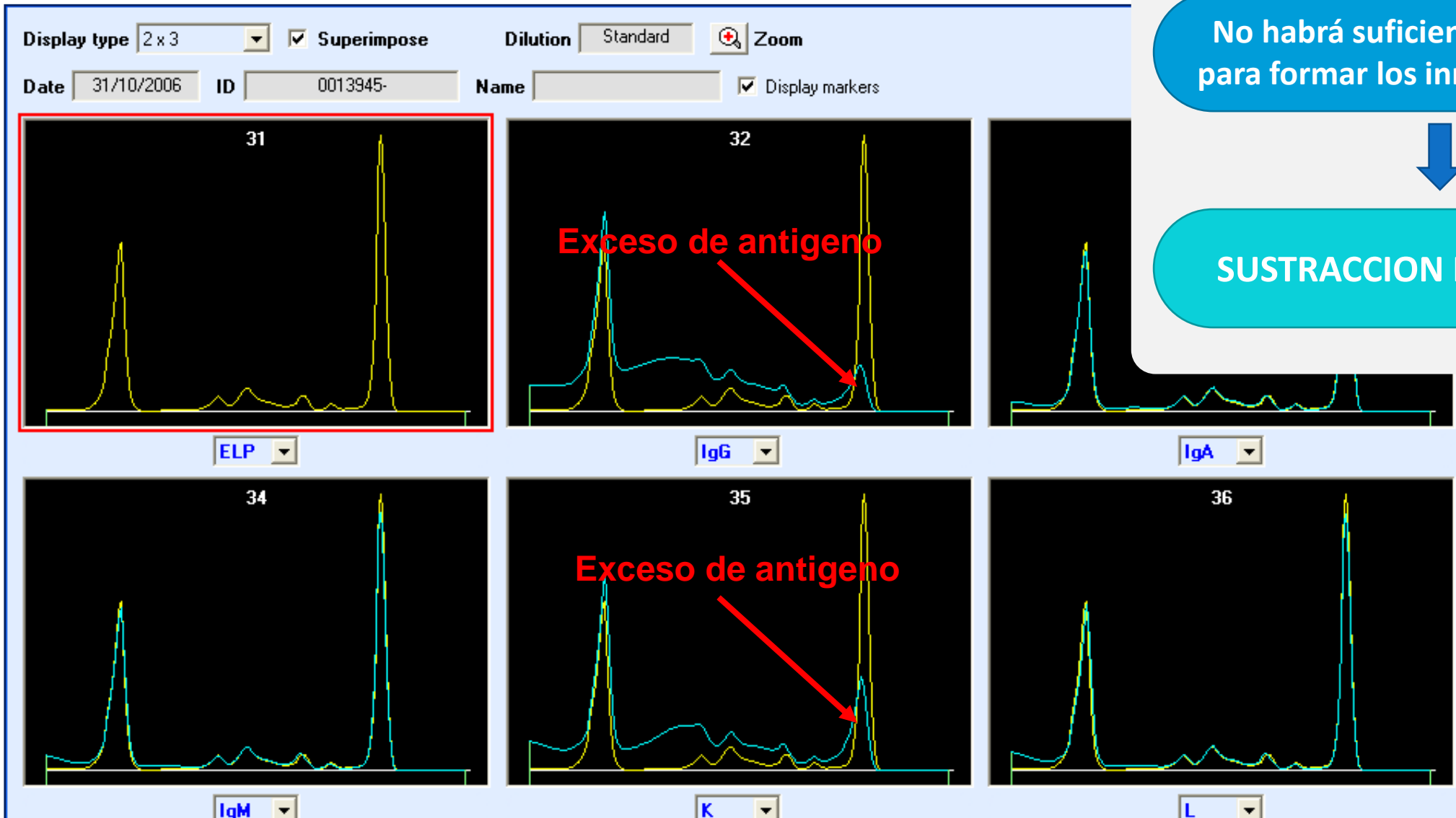
Error en la elección de la dilución

DILUCION MAS BAJA

No habrá suficiente ANTISUERO
para formar los inmunocomplejos



SUSTRACCION INCOMPLETA



Lista de trabajo IT



Archivo Lista Trabajo Edición de curvas Búsquedas B.datos Host Capillarys Utilidades Ventana Ayuda

Añadir Actualizar Imprimir Borrar

Modo	Desde	Fecha	P	Sec.	ID	Dilución	Fecha de extracción	Nombre/Lote	Edad	Fecha Nacimiento	Sexo	Sección	PT
	14/04/2021	05/12/2018	J	3	I0143615801	Estándar							66
	14/04/2021	05/12/2018	J	3	I0143619401	Hipogamma							7,3
	14/04/2021	05/12/2018	J	3	I0143620101	Hipergamma							4,1
	14/04/2021	05/12/2018	J	2	I0143608201	Hipergamma							94
	14/04/2021	05/12/2018	J	2	I0143613001	Estándar							8



Si no se selecciona ningún tipo de dilución, la muestra se analizará en dilución **ESTANDAR** por defecto

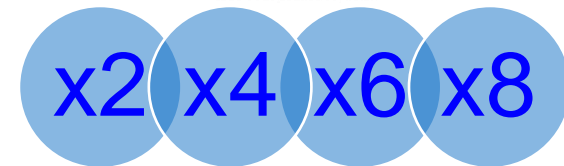
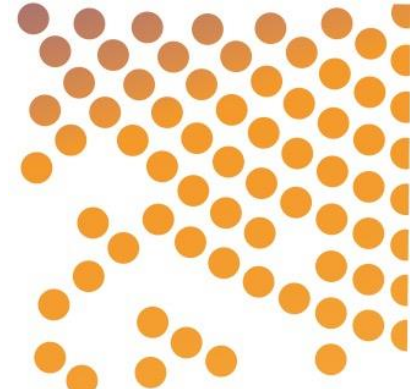
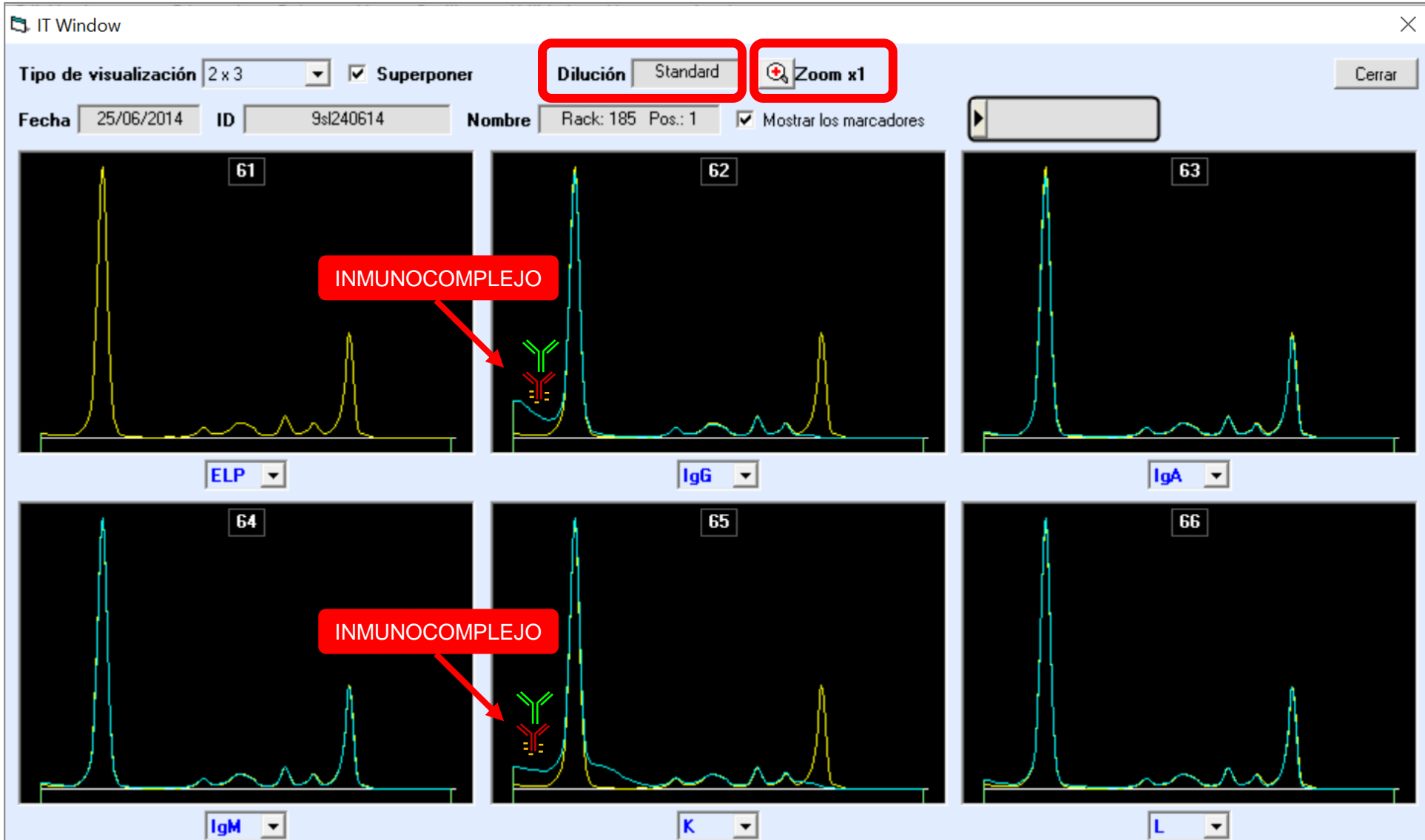
Cerrar Imprimir Opciones Borrar Borrar del... al... Desplazar Hydraplus/Assist. Lista IT Clasificar

Línea	Sec.	Nombre/Lote	Sexo	Fecha Nacimiento	Edad	Sección	ID	Fecha de extracción	PT	Fecha de trabajo
1	1						NORMAL CTL			05/12/2018
2	2						NORMAL CTL			05/12/2018
3	3						NORMAL CTL			05/12/2018
4	4						NORMAL CTL			05/12/2018
5	5						NORMAL CTL			05/12/2018
6	6						NORMAL CTL			05/12/2018
7	7						NORMAL CTL			05/12/2018
8	8						NORMAL CTL			05/12/2018
9	9						I0143523401		7,2	05/12/2018
10	10						I0143524101		7,5	05/12/2018
11	11						I0143524201		7,1	05/12/2018
12	12						I0143556901		7	05/12/2018

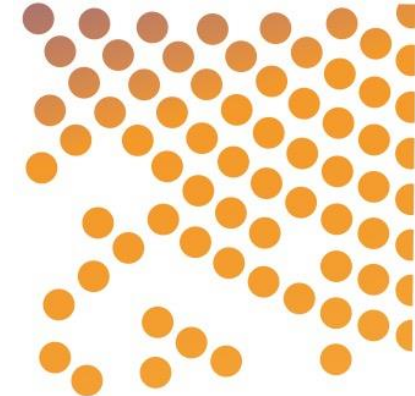
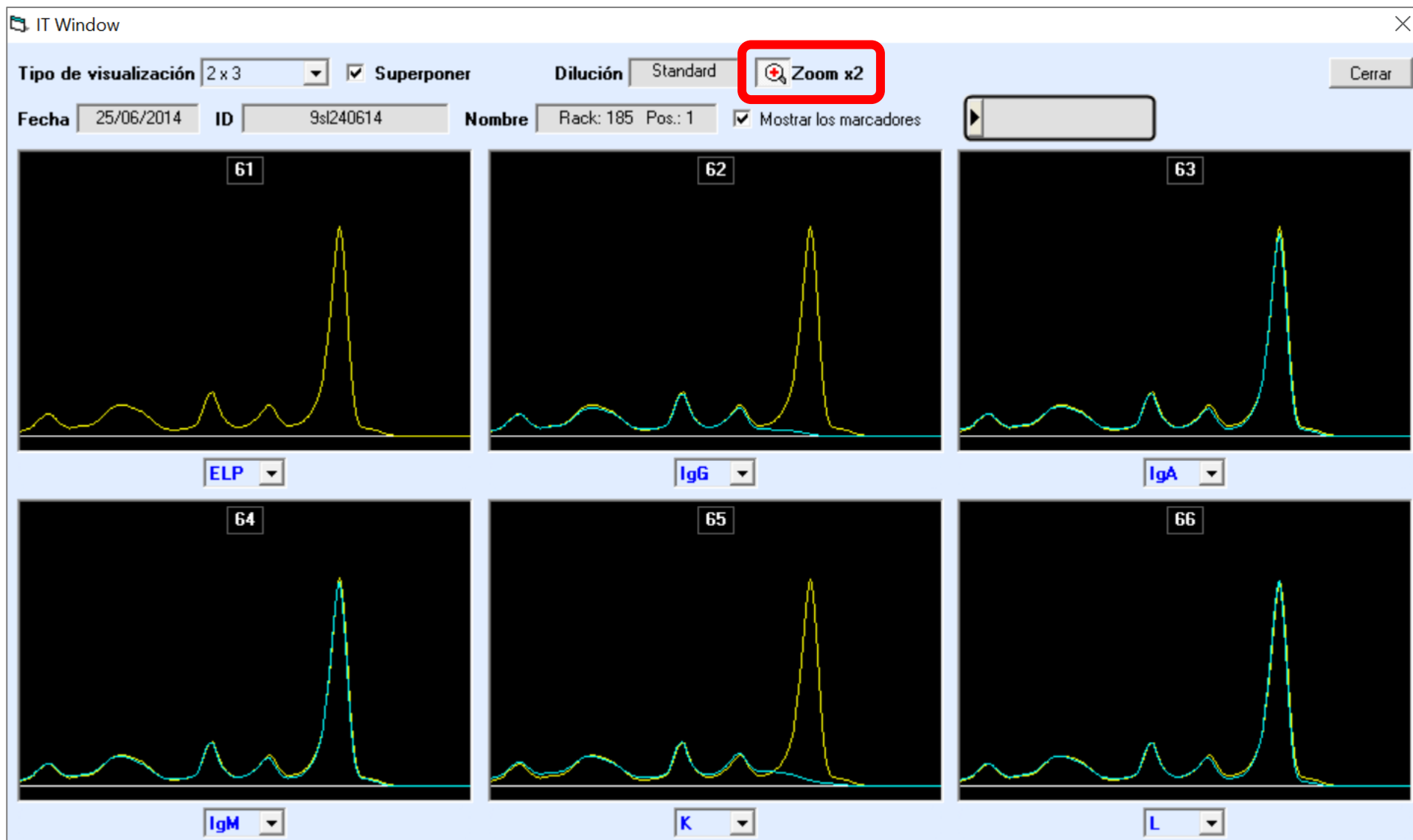


RESULTADO DE IMMUNOTYPING

Resultado de IT



Resultado de IT



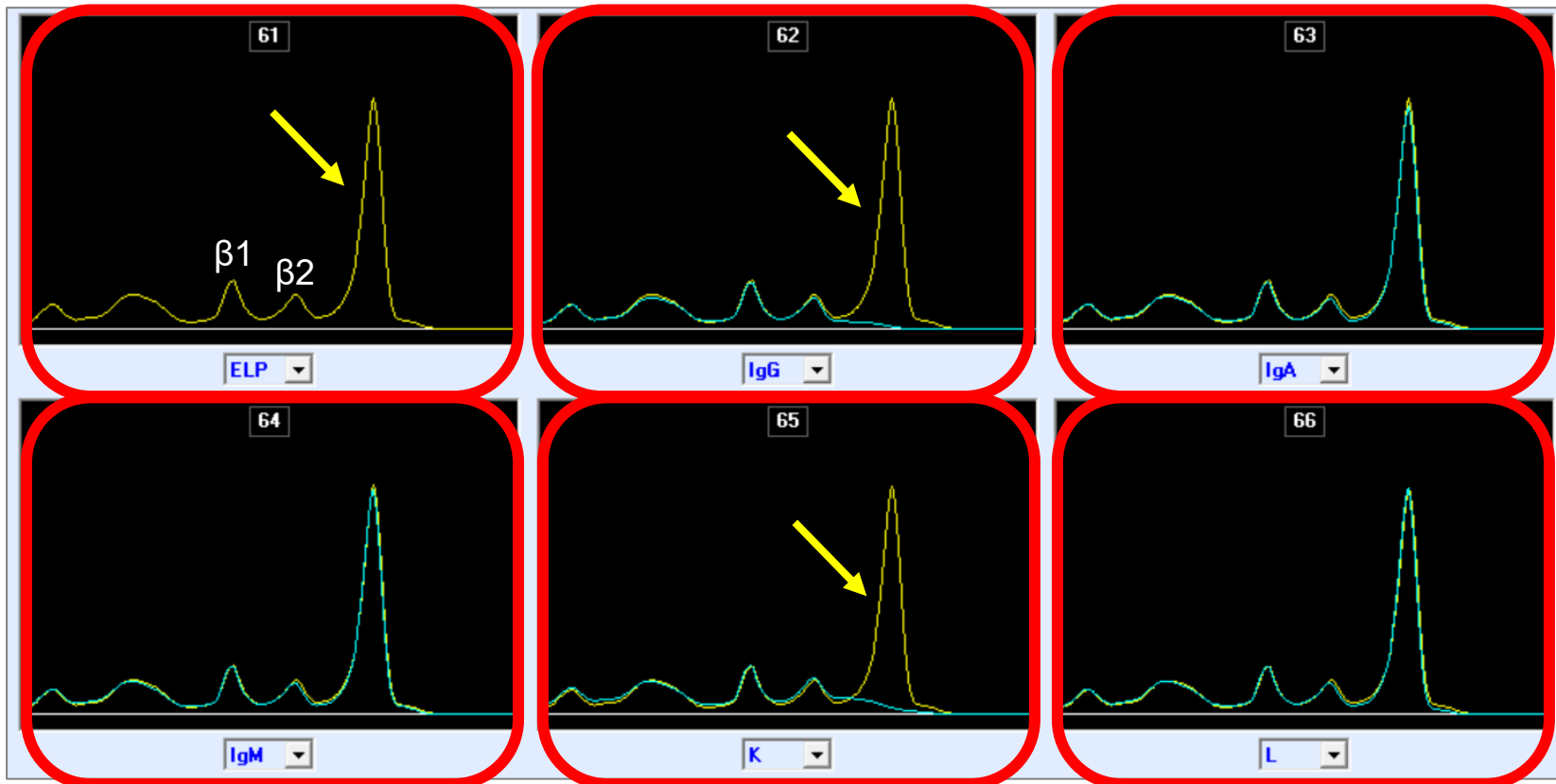
Recomendaciones de interpretación



Paso 1: Localizar la anomalía en la curva de referencia

Paso 2: Comparar la curva de referencia (amarilla) con la curva residual (azul) en cada uno de los cuadros

Paso 3: Buscar la desaparición (sustracción) de la anomalía

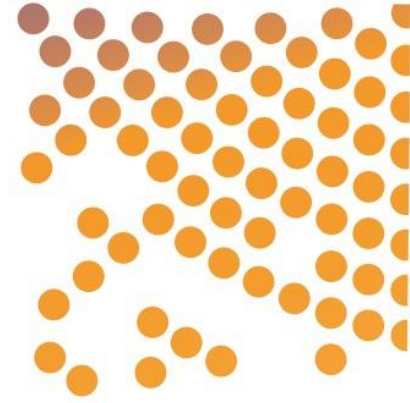


CONCLUSION:
Presencia de un pico monoclonal IgG Kappa

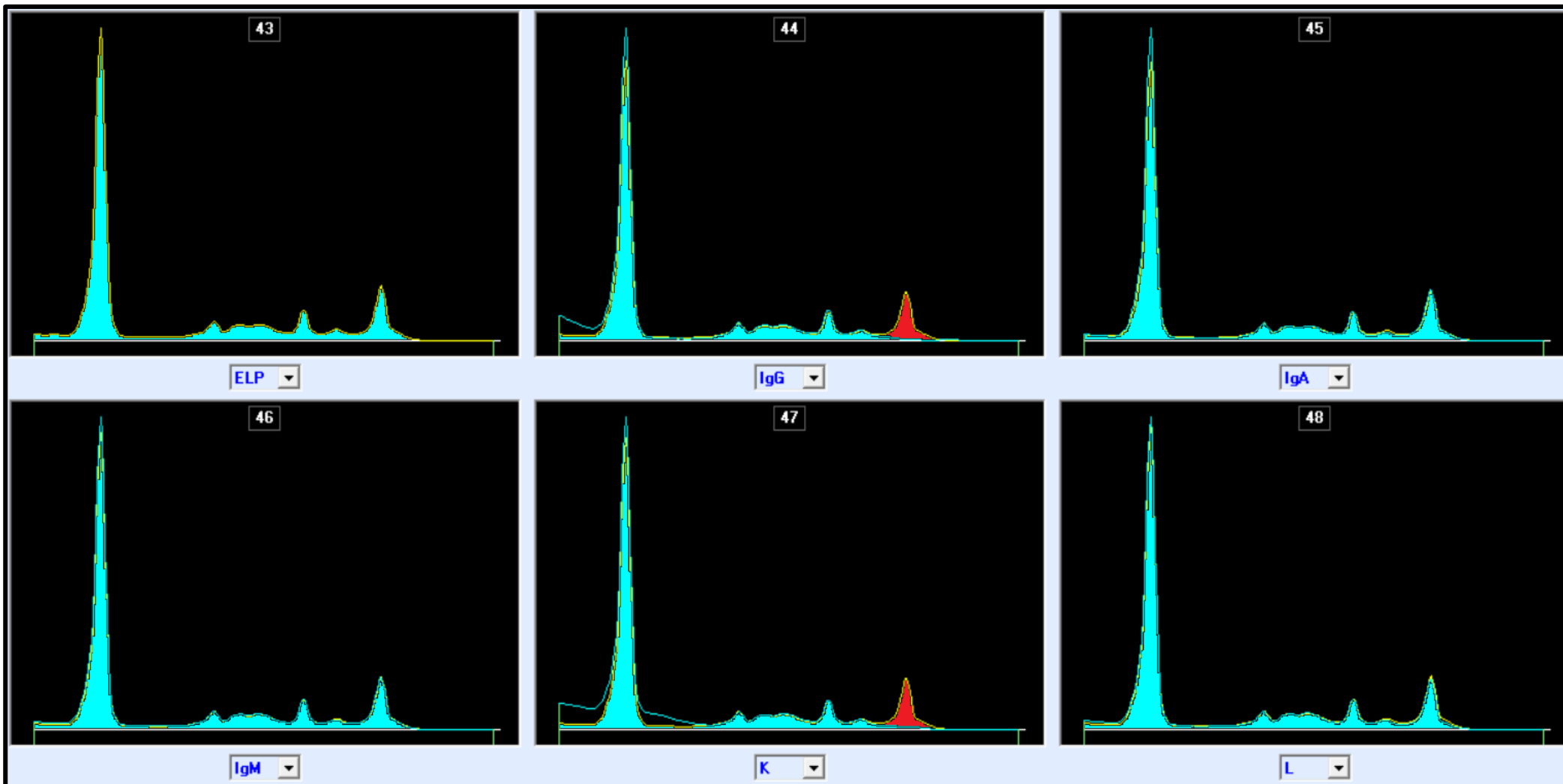
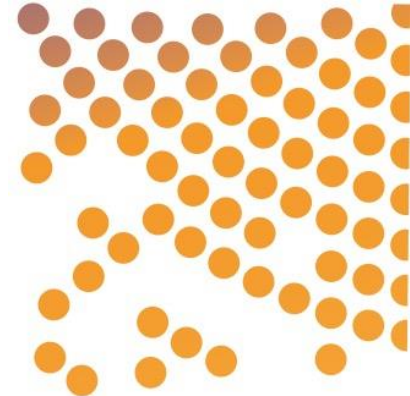


INTERPRETACION DE RESULTADOS

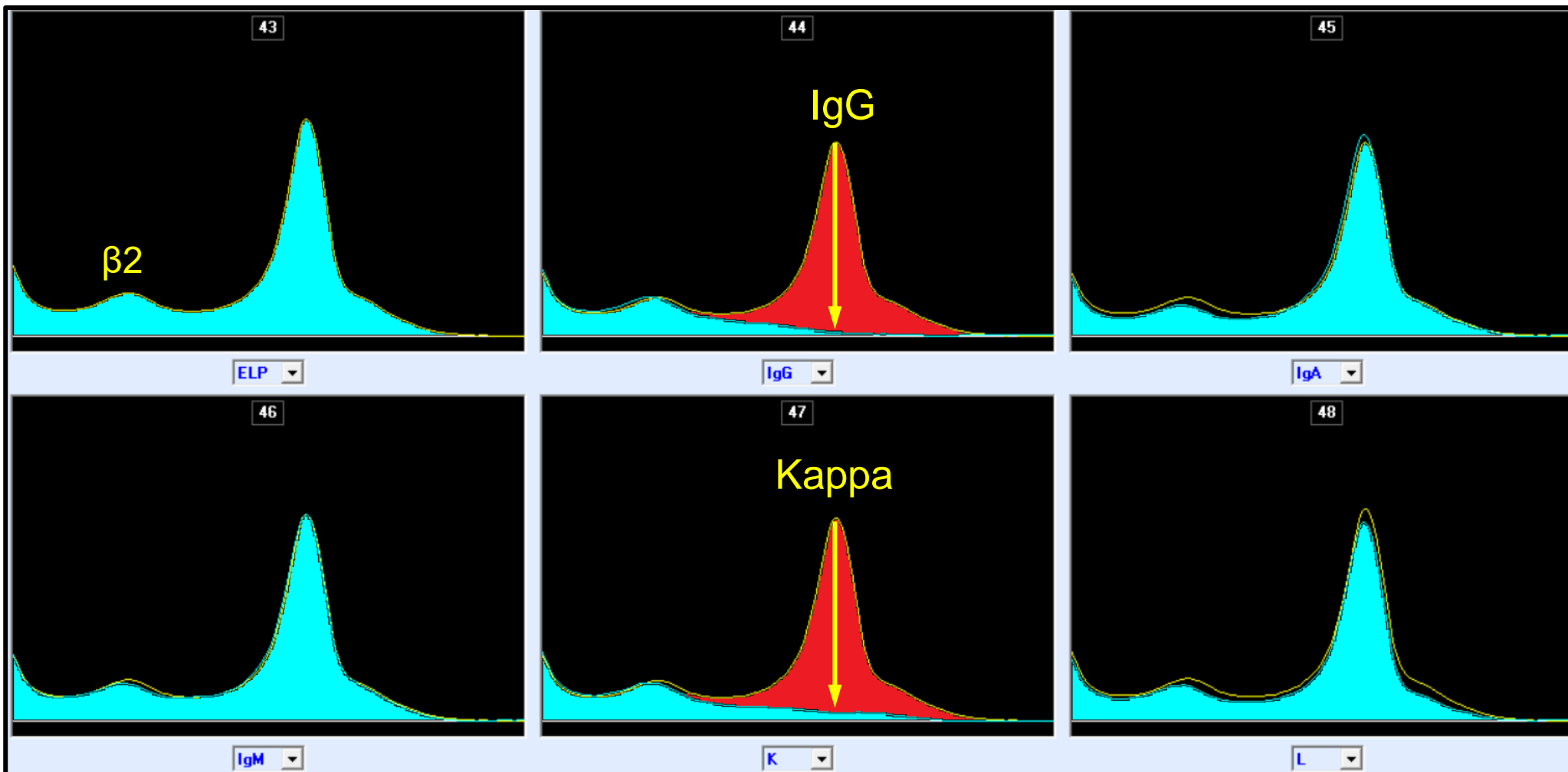
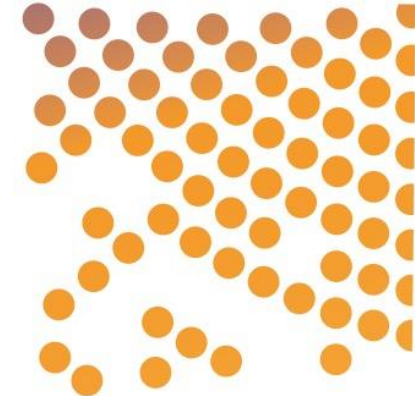
CASO 1: Electroforesis de proteínas séricas



CASO 1: Immunotyping (sin zoom)

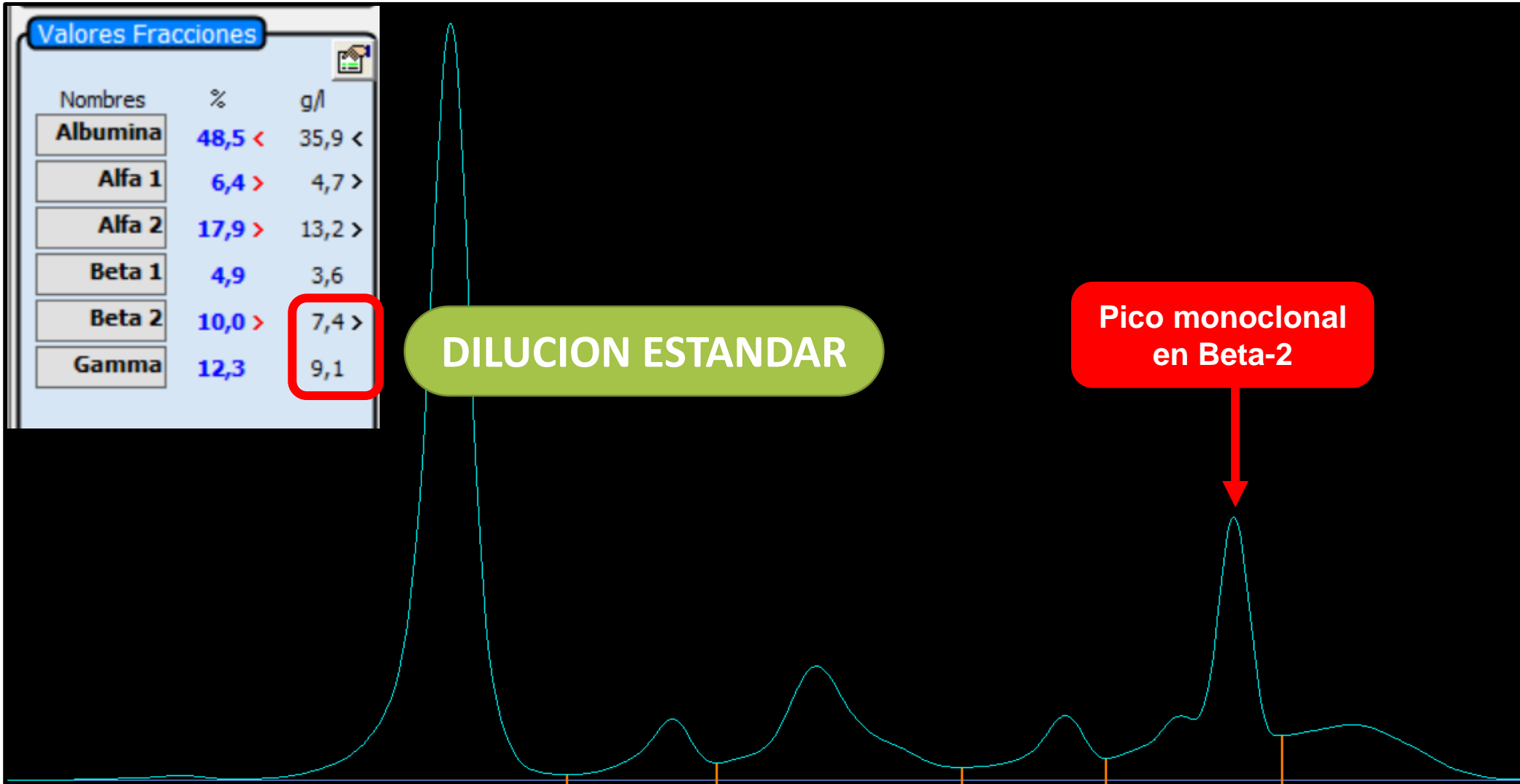
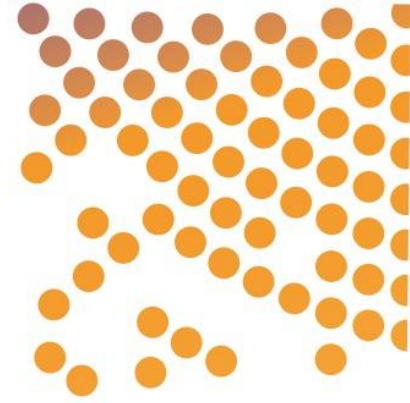


CASO 1: Immunotyping (zoom x4)

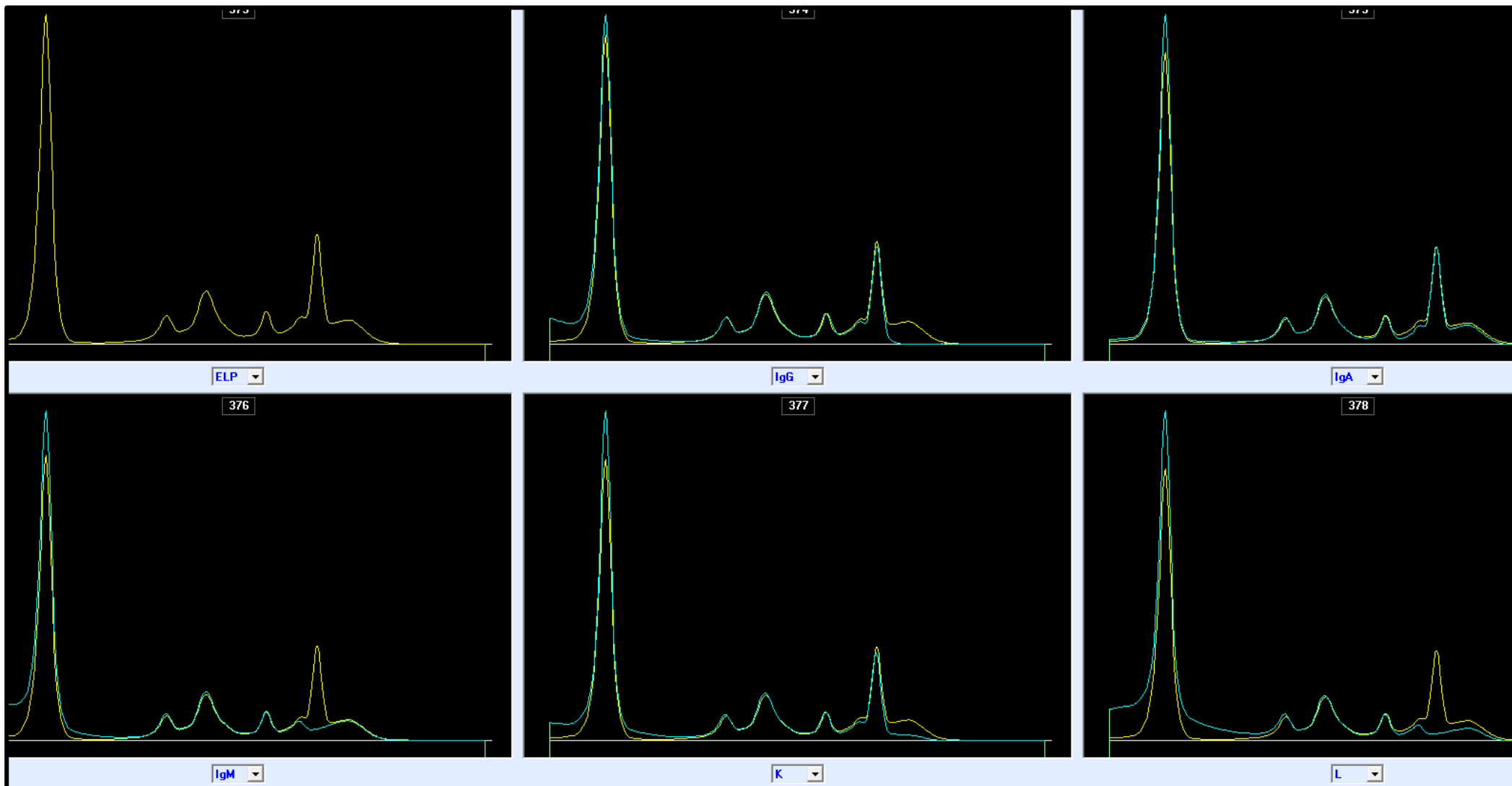
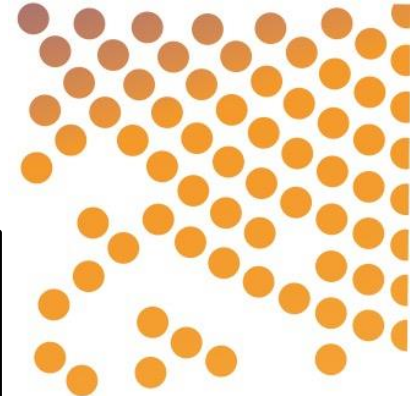


CONCLUSION: Presencia de IgG Kappa

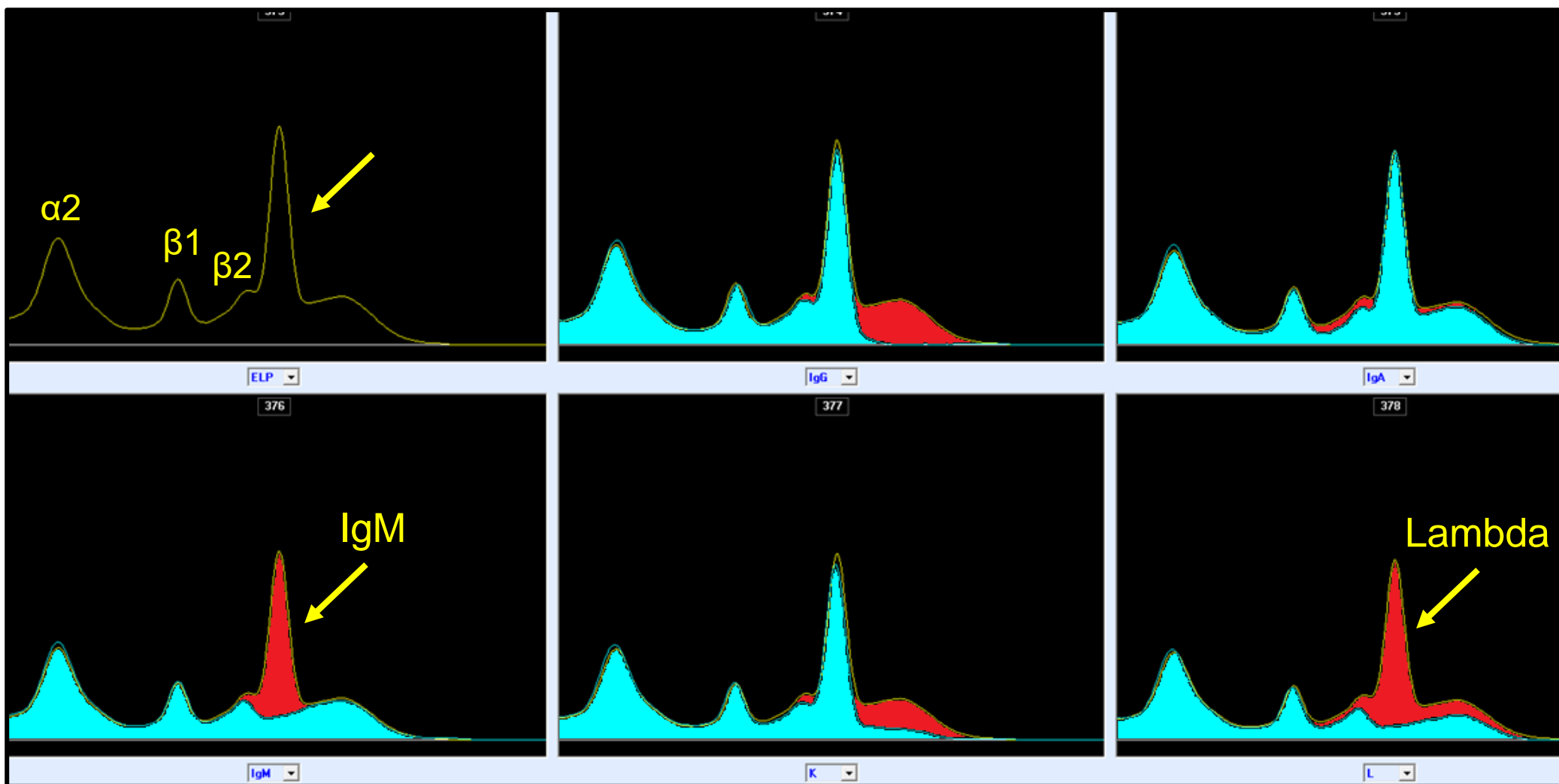
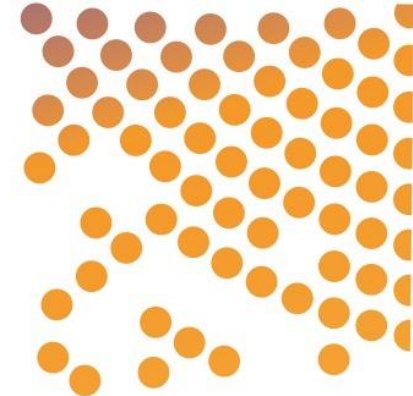
CASO 2: Electroforesis de proteínas séricas



CASO 2: Immunotyping (sin zoom)



CASO 2: Immunotyping (zoom x4)



CONCLUSION: Presencia de IgM Lambda (entre beta-2 y gamma)

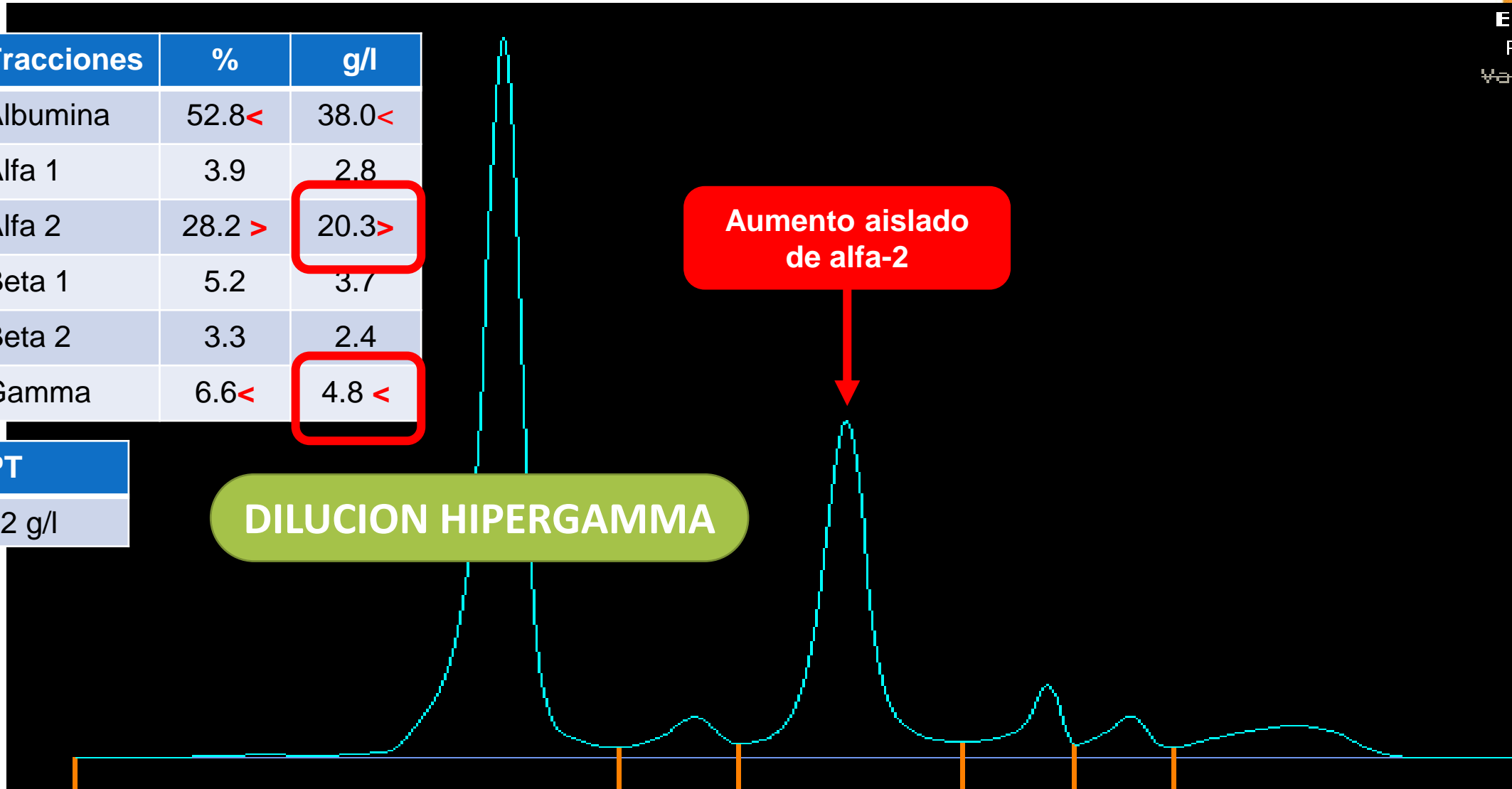
CASO 3: Electroforesis de proteínas séricas

Fracciones	%	g/l
Albumina	52.8<	38.0<
Alfa 1	3.9	2.8
Alfa 2	28.2 >	20.3>
Beta 1	5.2	3.7
Beta 2	3.3	2.4
Gamma	6.6<	4.8 <

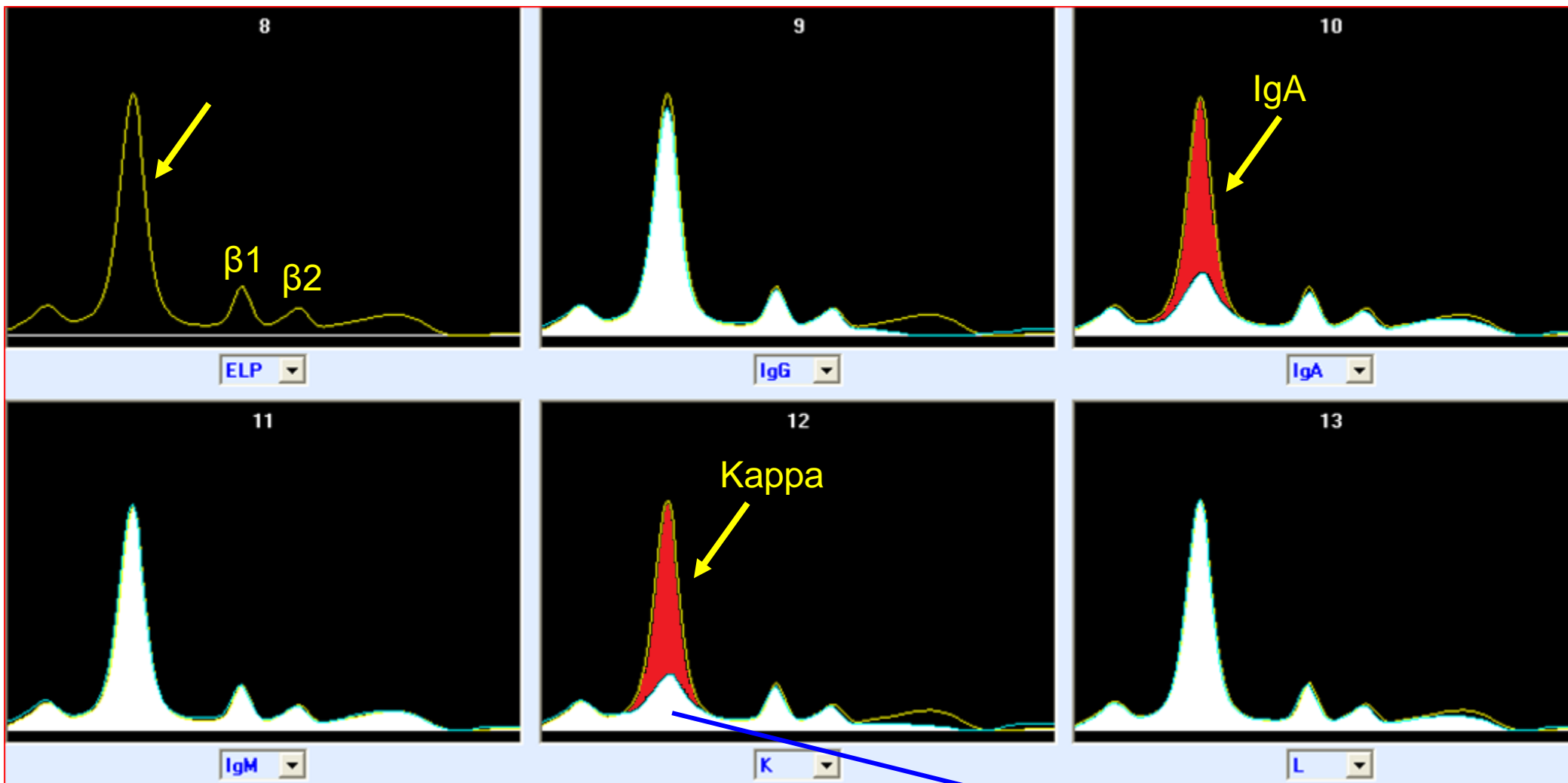
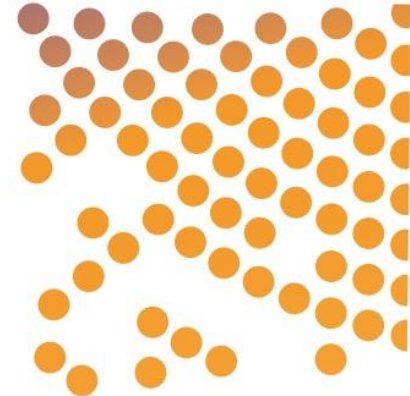
PT
72 g/l

DILUCION HIPERGAMMA

Aumento aislado de alfa-2



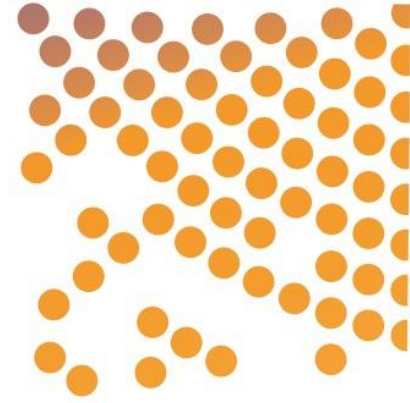
CASO 3: Immunotyping (zoom x4)



CONCLUSION: Presencia de IgA Kappa (en alfa-2)

Alfa-2 = haptoglobina, $\alpha 2$ macroglobulina

CASO 4: Electroforesis de proteínas séricas

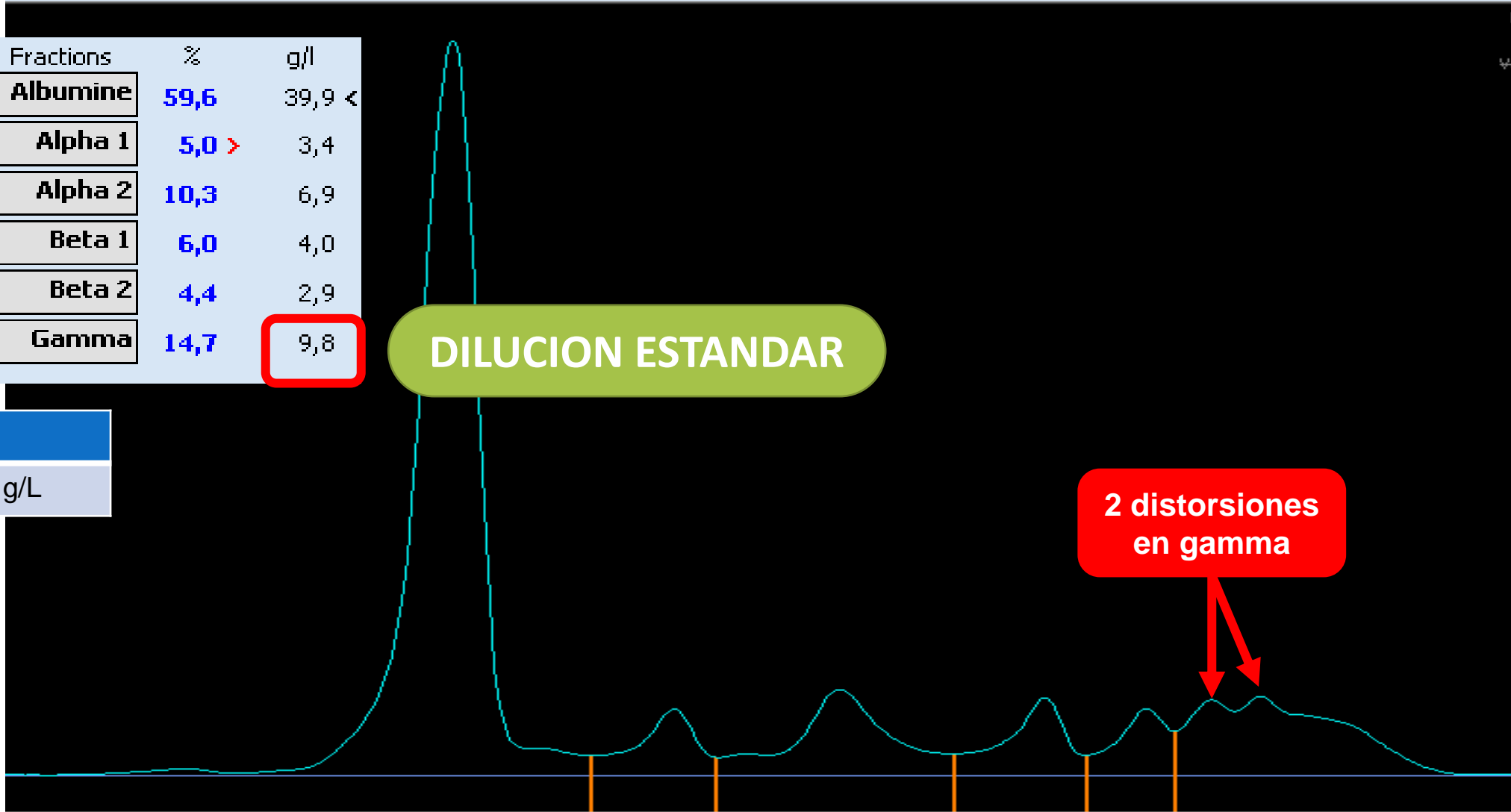


Fractions	%	g/l
Albumine	59,6	39,9 <
Alpha 1	5,0 >	3,4
Alpha 2	10,3	6,9
Beta 1	6,0	4,0
Beta 2	4,4	2,9
Gamma	14,7	9,8

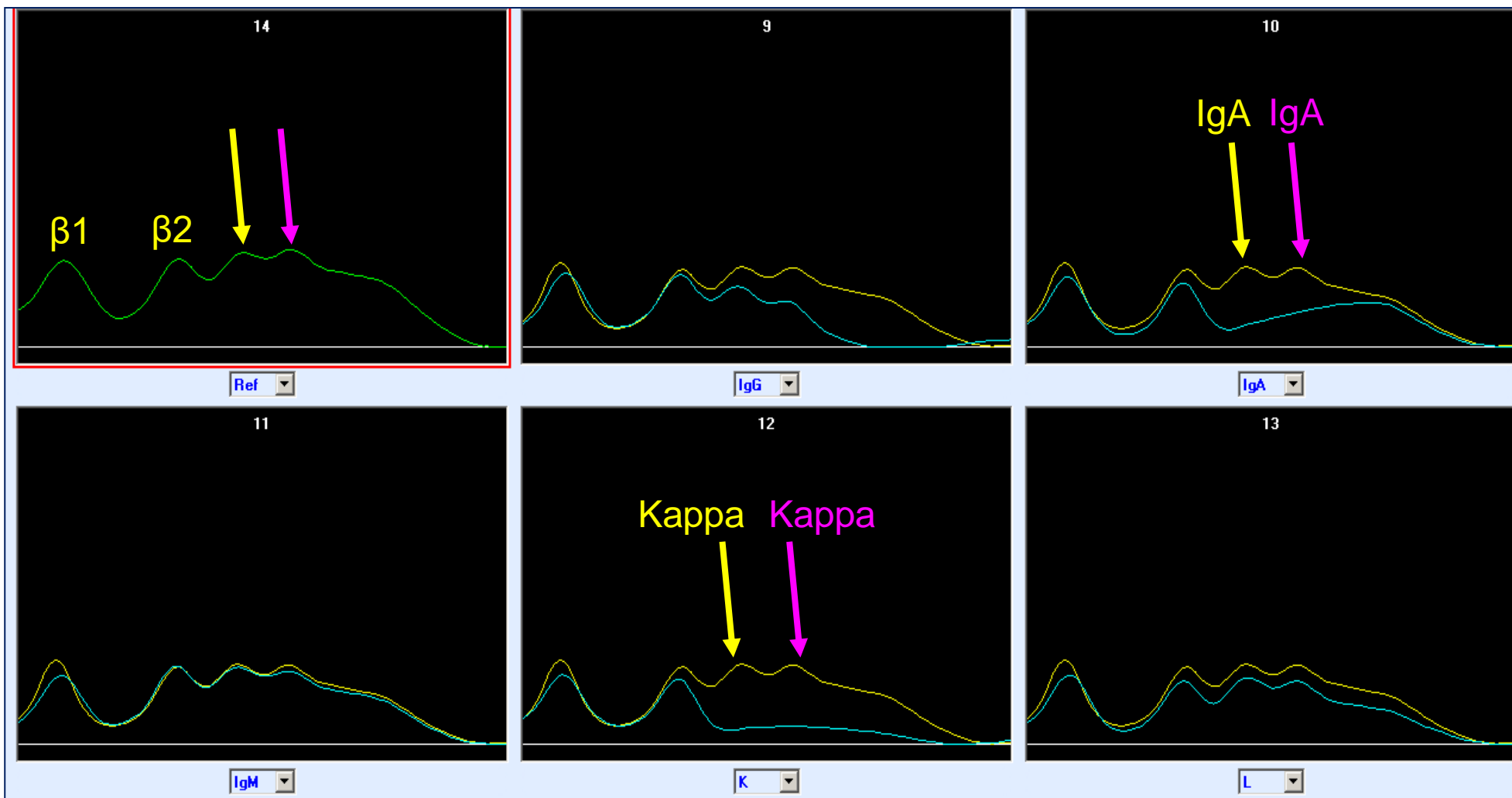
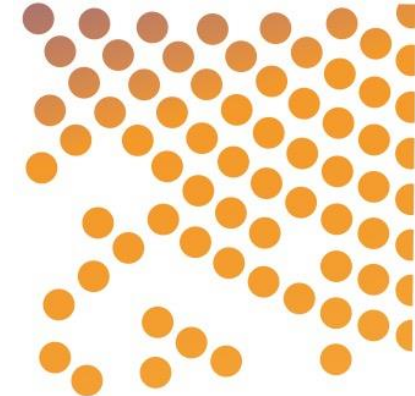
DILUCION ESTANDAR

PT
67 g/L

2 distorsiones en gamma



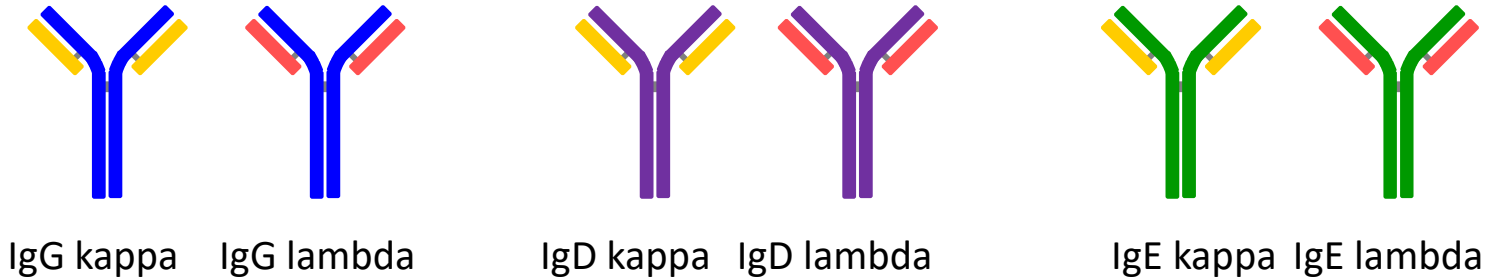
CASO 4: Immunotyping (zoom x4)



CONCLUSION: Presencia de 2 IgA Kappa

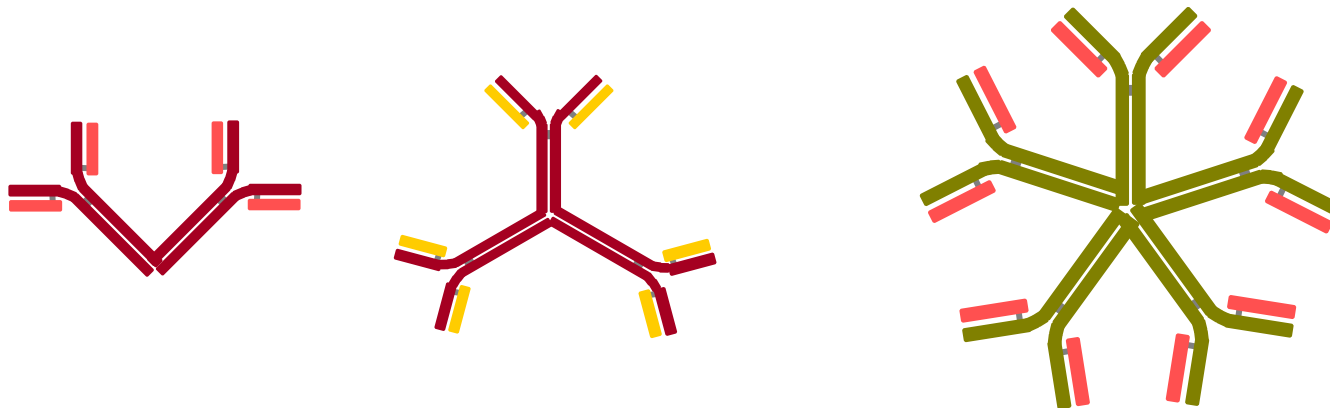
Estructura de las inmunoglobulinas

IgG, IgD, IgE no polimerizan:



- Solo forma monomérica
- PM \approx 150 kD
- IgG, IgD e IgE monoclonales **migran como un único pico**

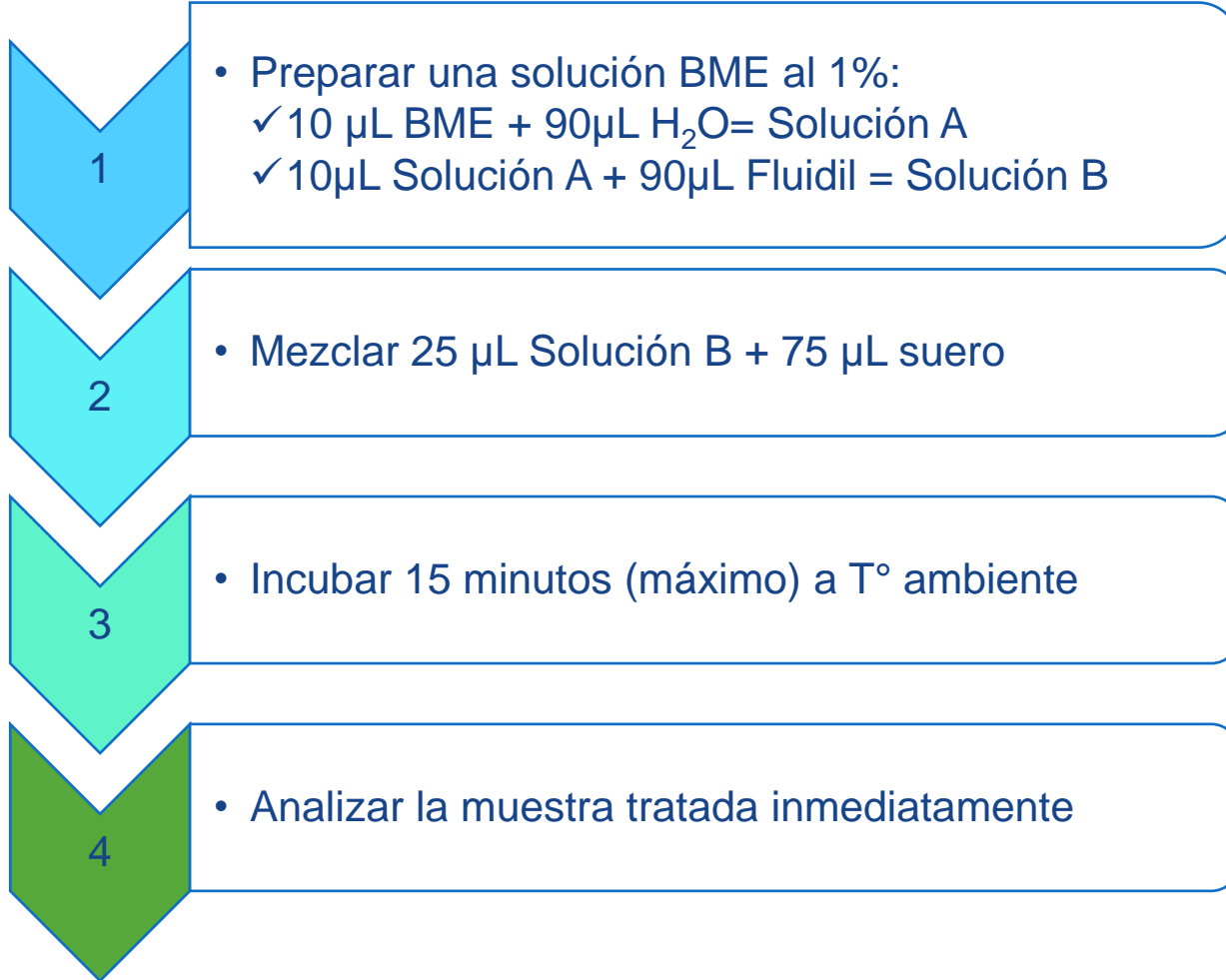
IgA, IgM y cadenas livianas libres pueden polimerizar:



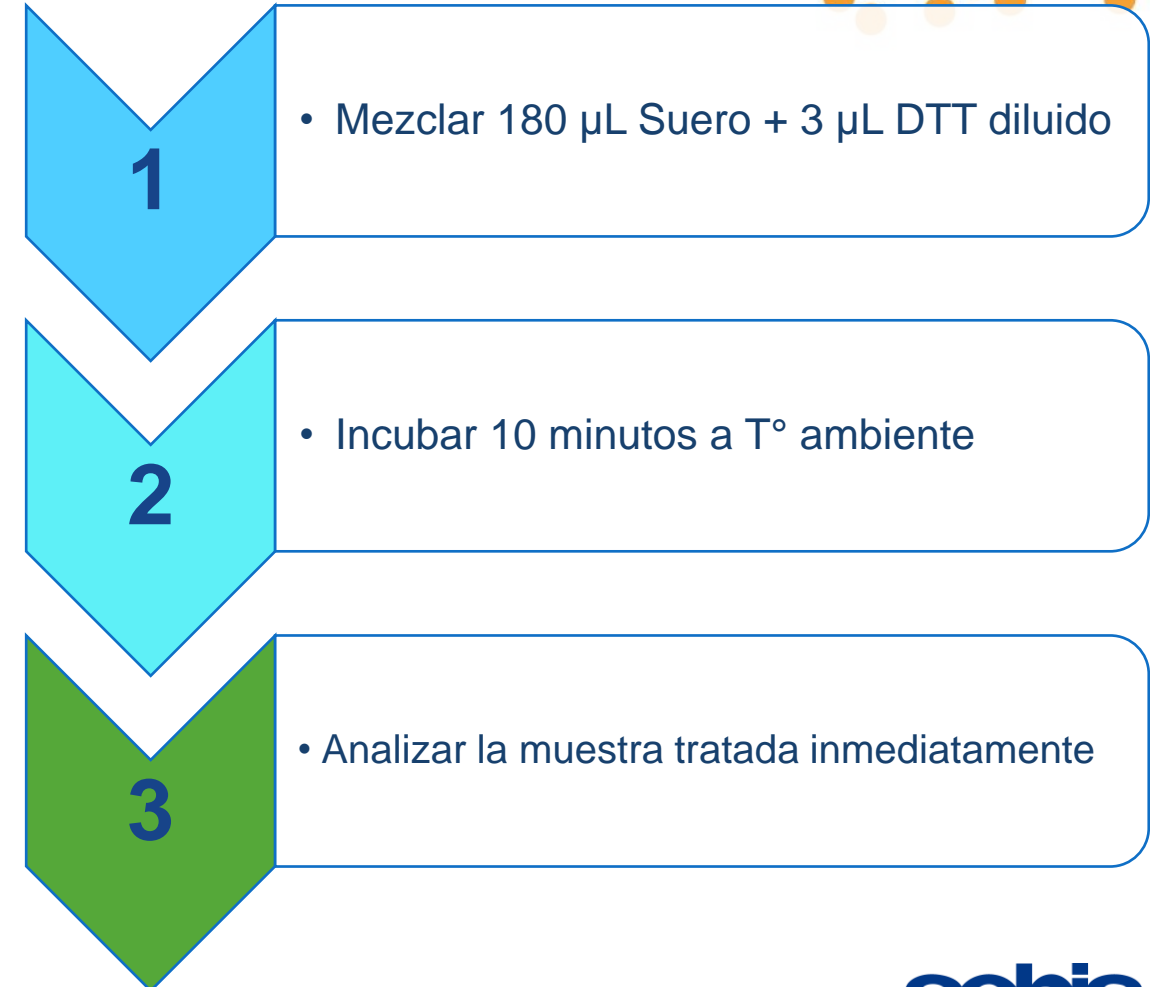
- Polimerización de moléculas idénticas procedentes de la misma célula.
- IgA, IgM y CLL monoclonales pueden dar **mas de un pico de diferente migración**

Tratamientos reductores

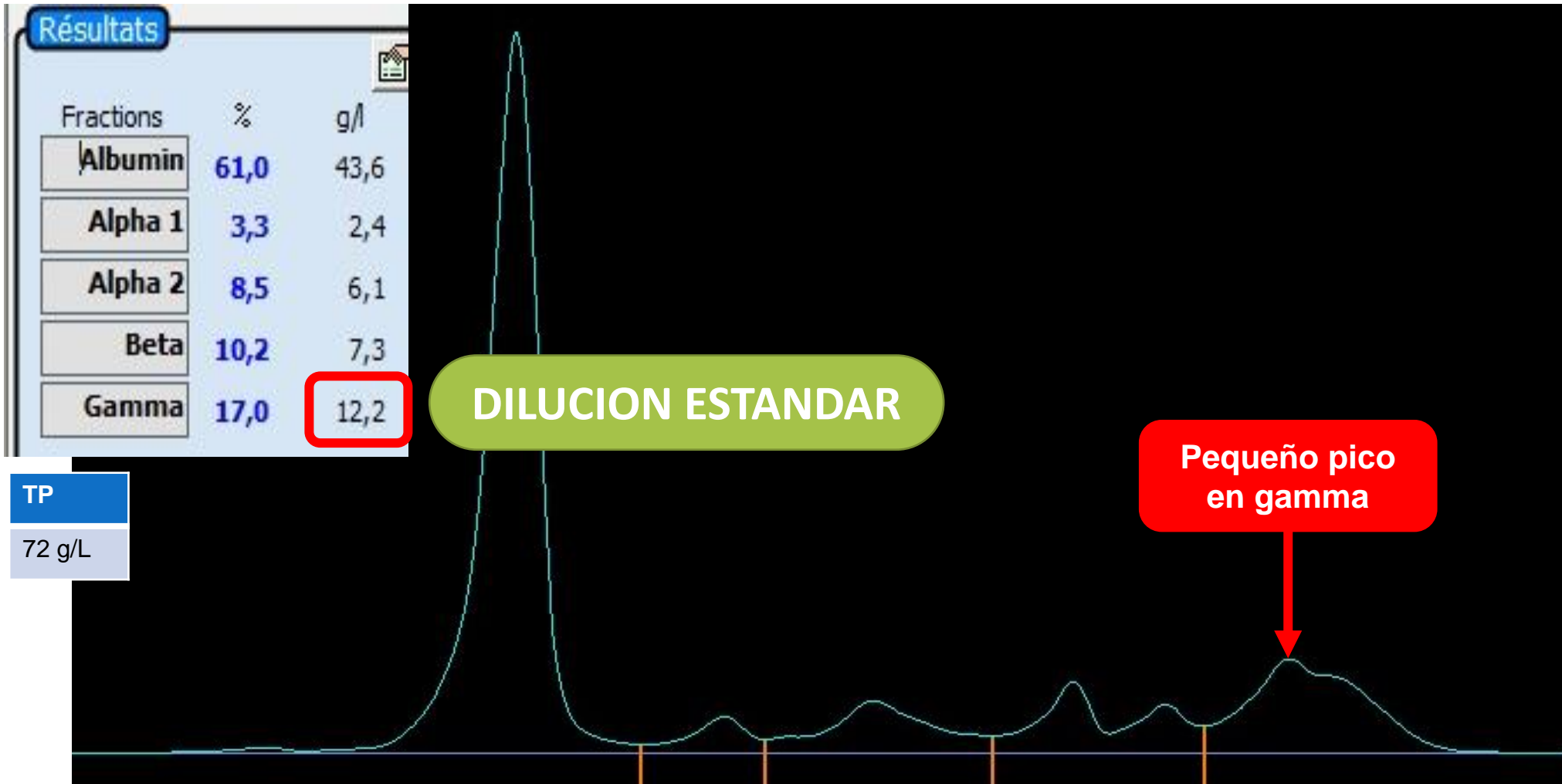
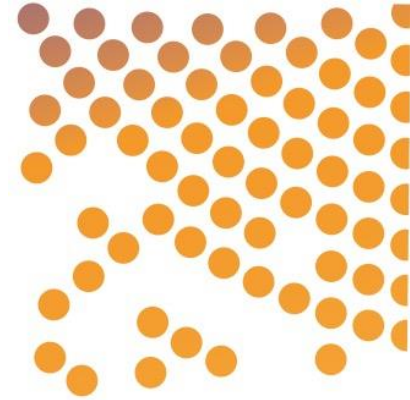
Tratamiento reductor con betamercaptoetanol (BME)



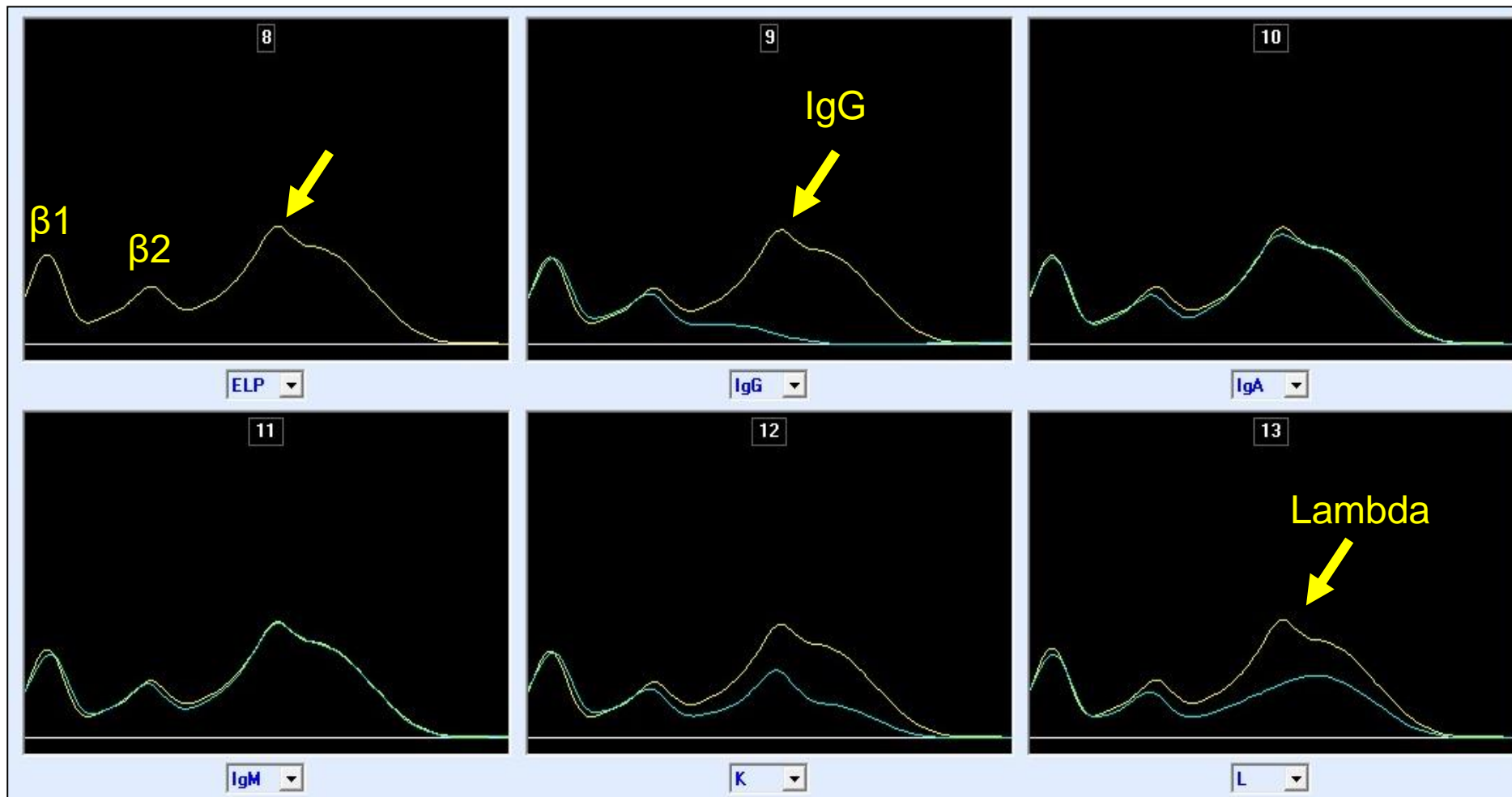
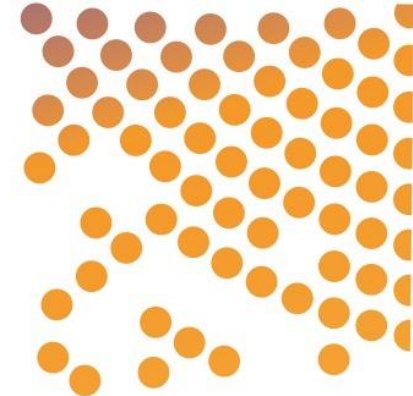
Tratamiento reductor con ditiotreitól (DTT)



CASO 5: Electroforesis de proteínas séricas

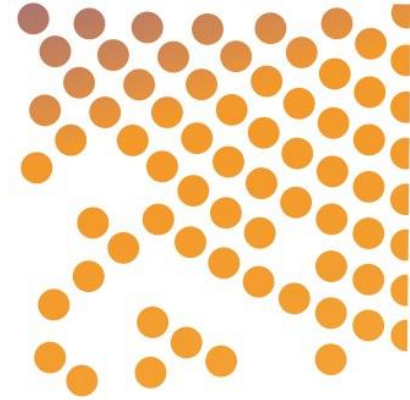


CASO 5: Immunotyping (zoom x4)



CONCLUSION: Presencia de una pequeña IgG Lambda

CASO 6: Electroforesis de proteínas séricas

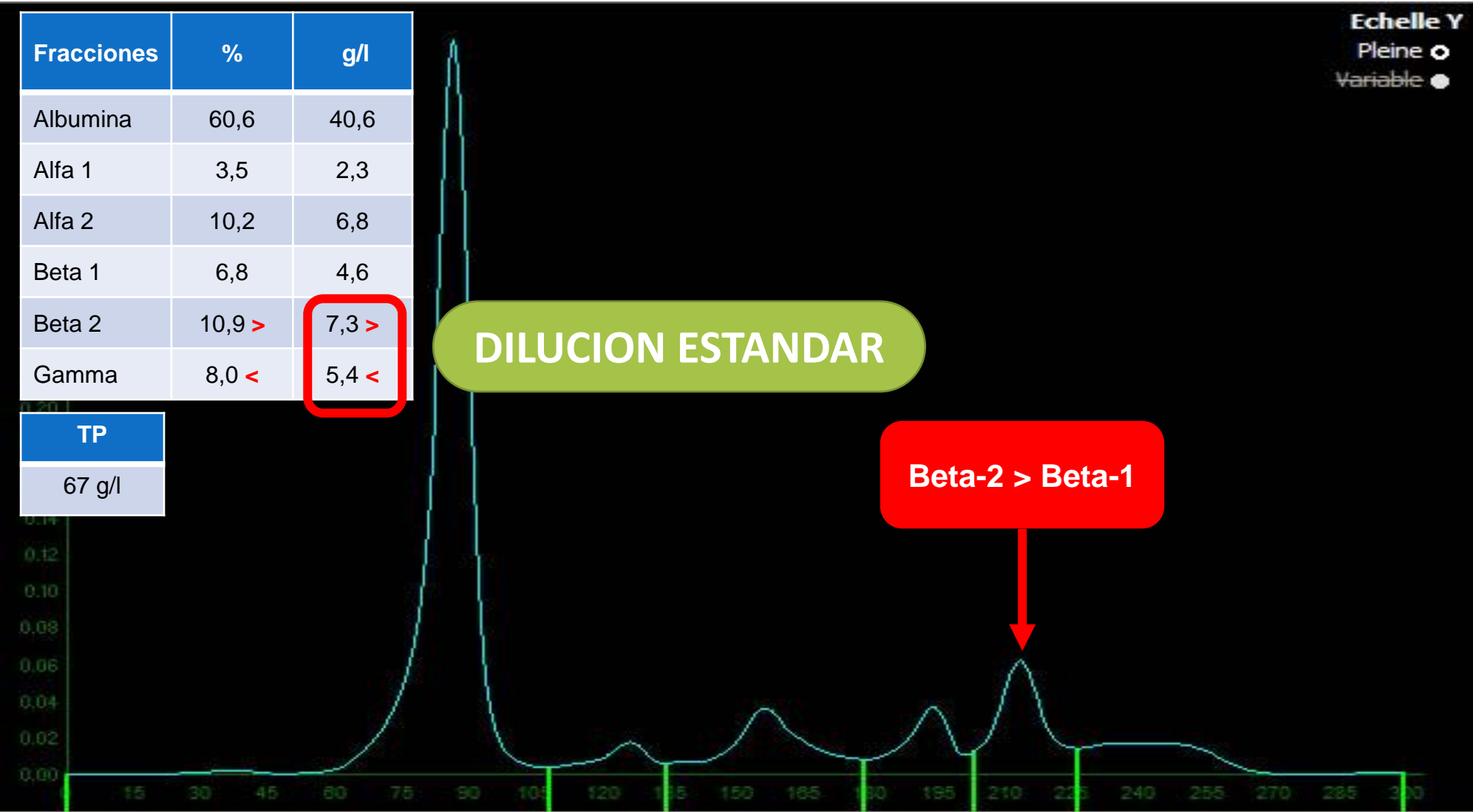


Fracciones	%	g/l
Albumina	60,6	40,6
Alfa 1	3,5	2,3
Alfa 2	10,2	6,8
Beta 1	6,8	4,6
Beta 2	10,9 >	7,3 >
Gamma	8,0 <	5,4 <

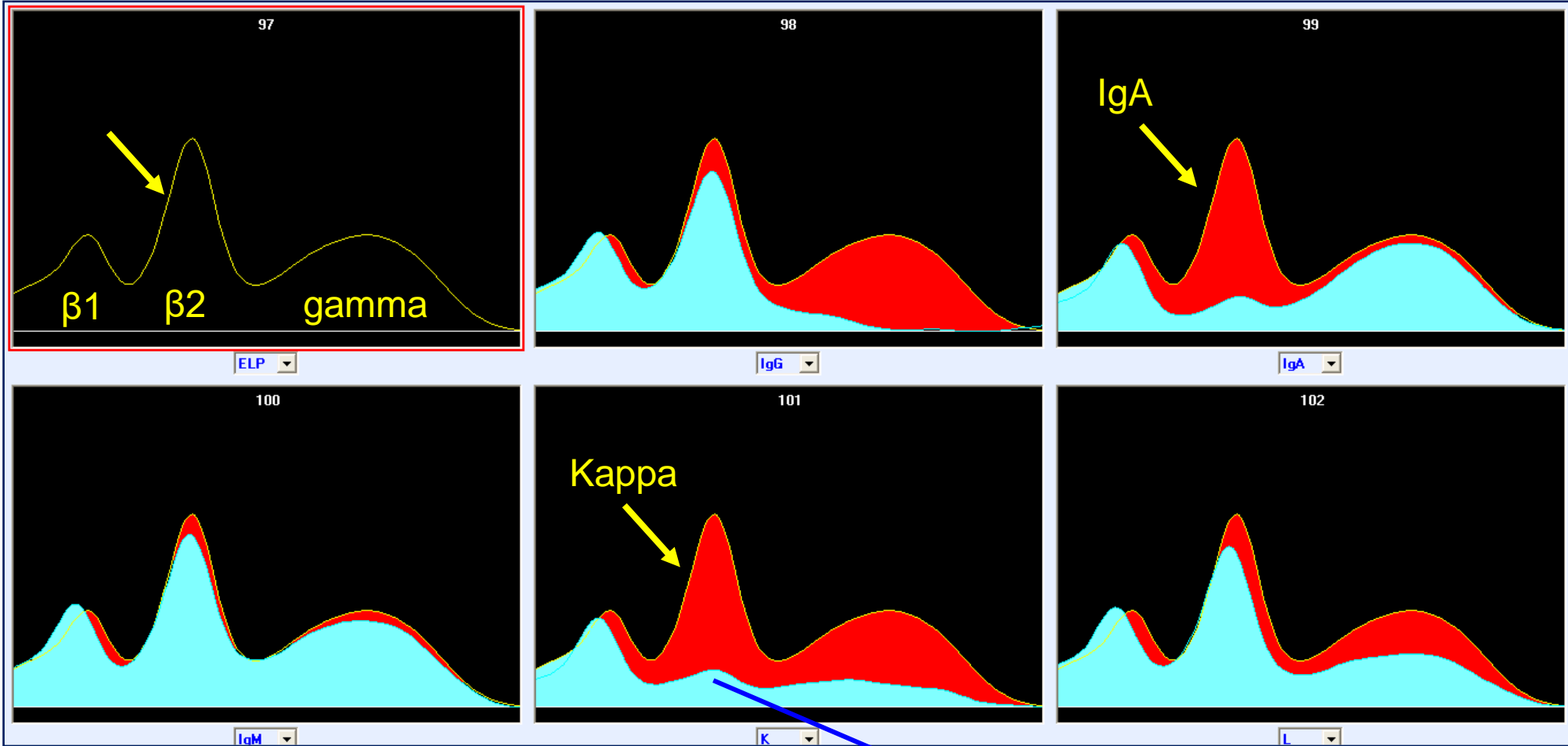
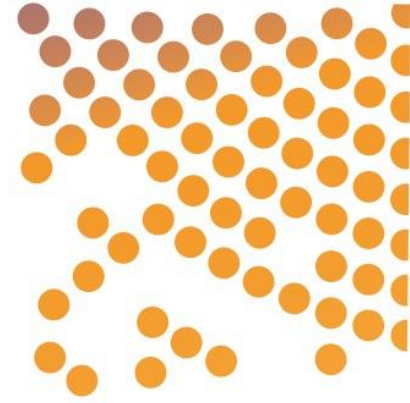
TP
67 g/l

DILUCION ESTANDAR

Beta-2 > Beta-1



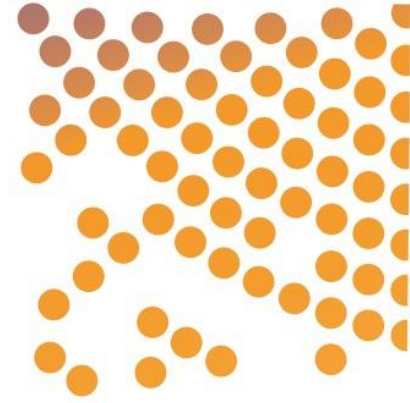
CASO 6: Immunotyping (zoom x4)



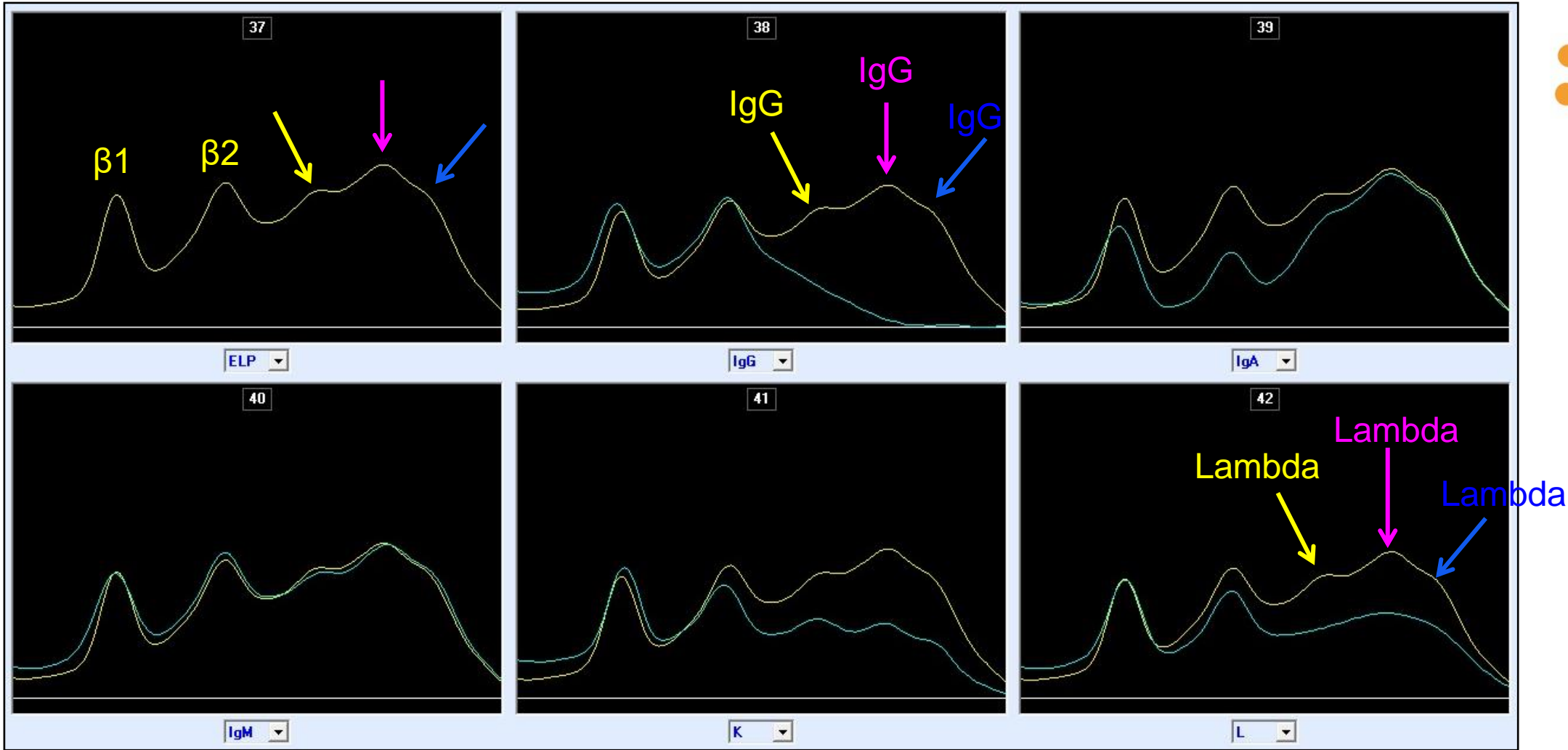
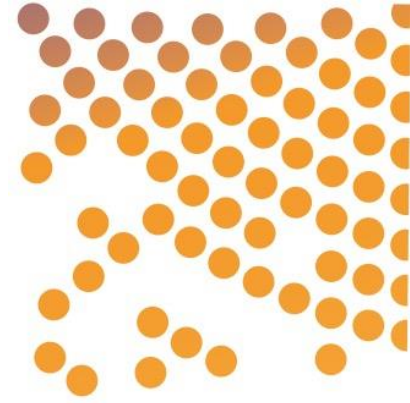
CONCLUSION: Presencia de IgA Kappa

Beta-2 = Complemento C3

CASO 7: Electroforesis de proteínas séricas

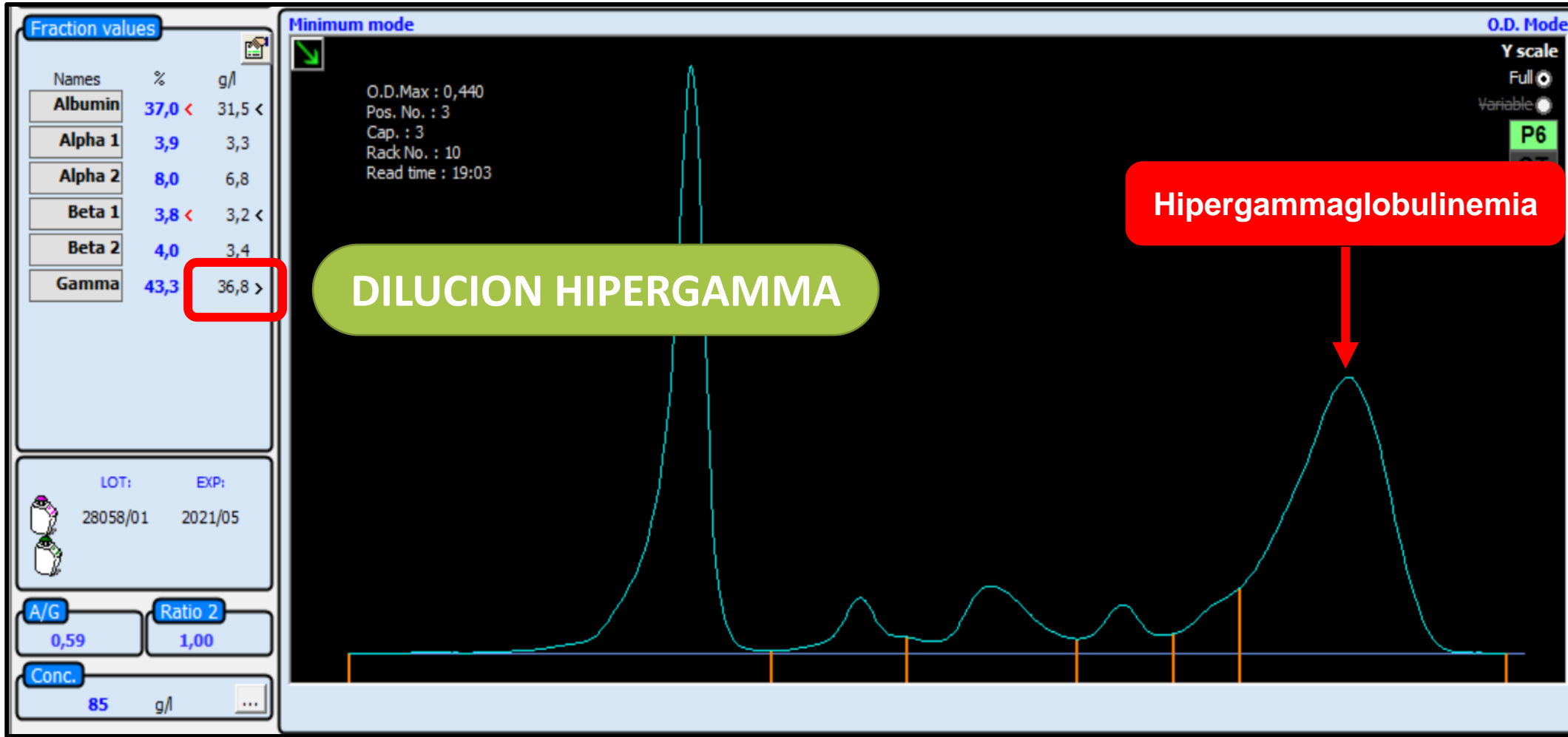


CASO 7: Immunotyping (zoom x4)

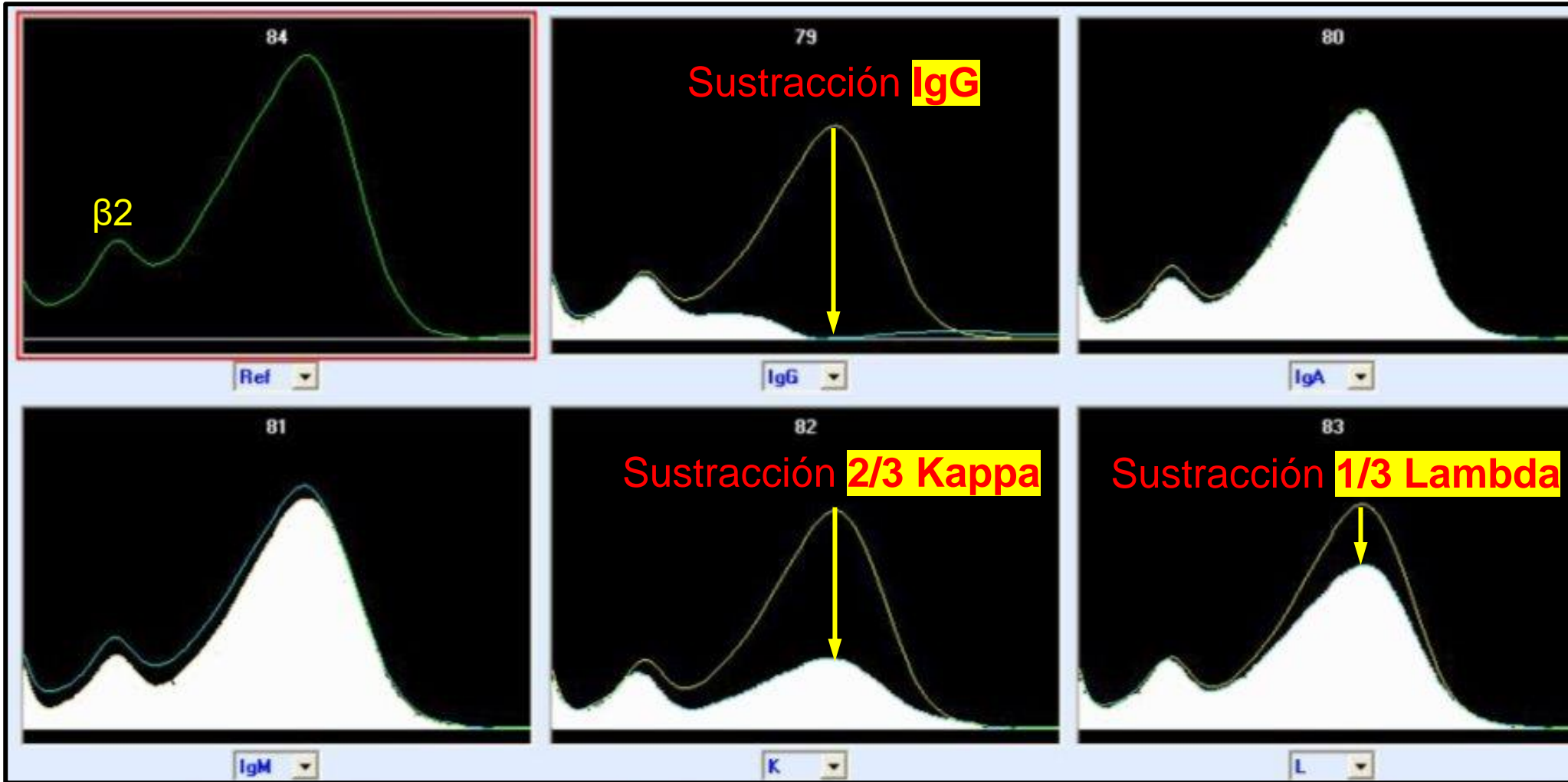
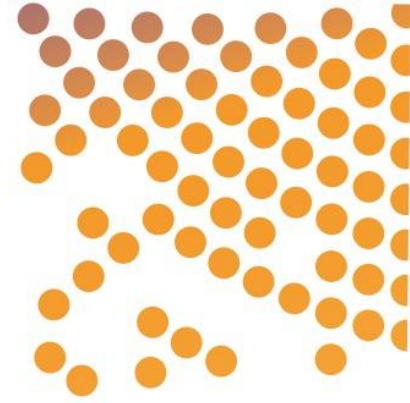


CONCLUSION: Presencia de 3 IgG Lambda = Perfil oligoclonal

CASO 8: Electroforesis de proteínas séricas

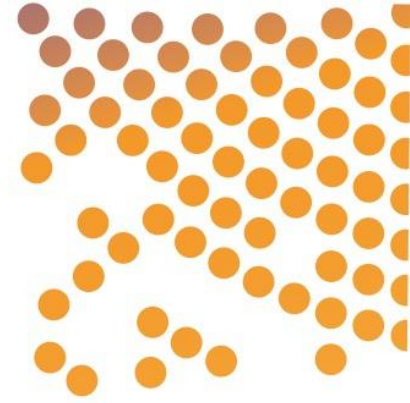


CASO 8: Immunotyping (zoom x4)



CONCLUSION: Aumento policlonal de IgG

CASO 9: Electroforesis de proteínas séricas

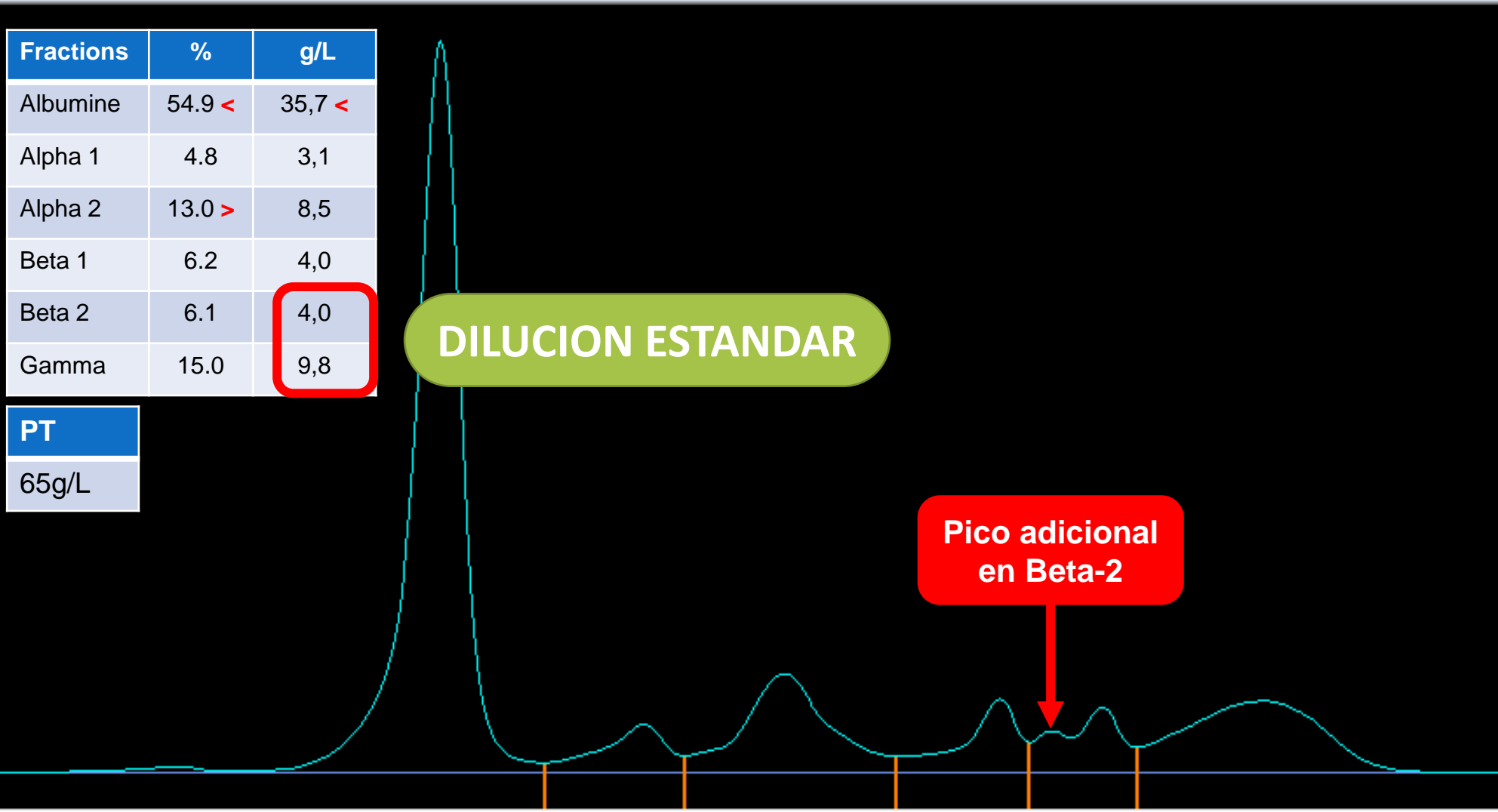


Fractions	%	g/L
Albumine	54.9 <	35,7 <
Alpha 1	4.8	3,1
Alpha 2	13.0 >	8,5
Beta 1	6.2	4,0
Beta 2	6.1	4,0
Gamma	15.0	9,8

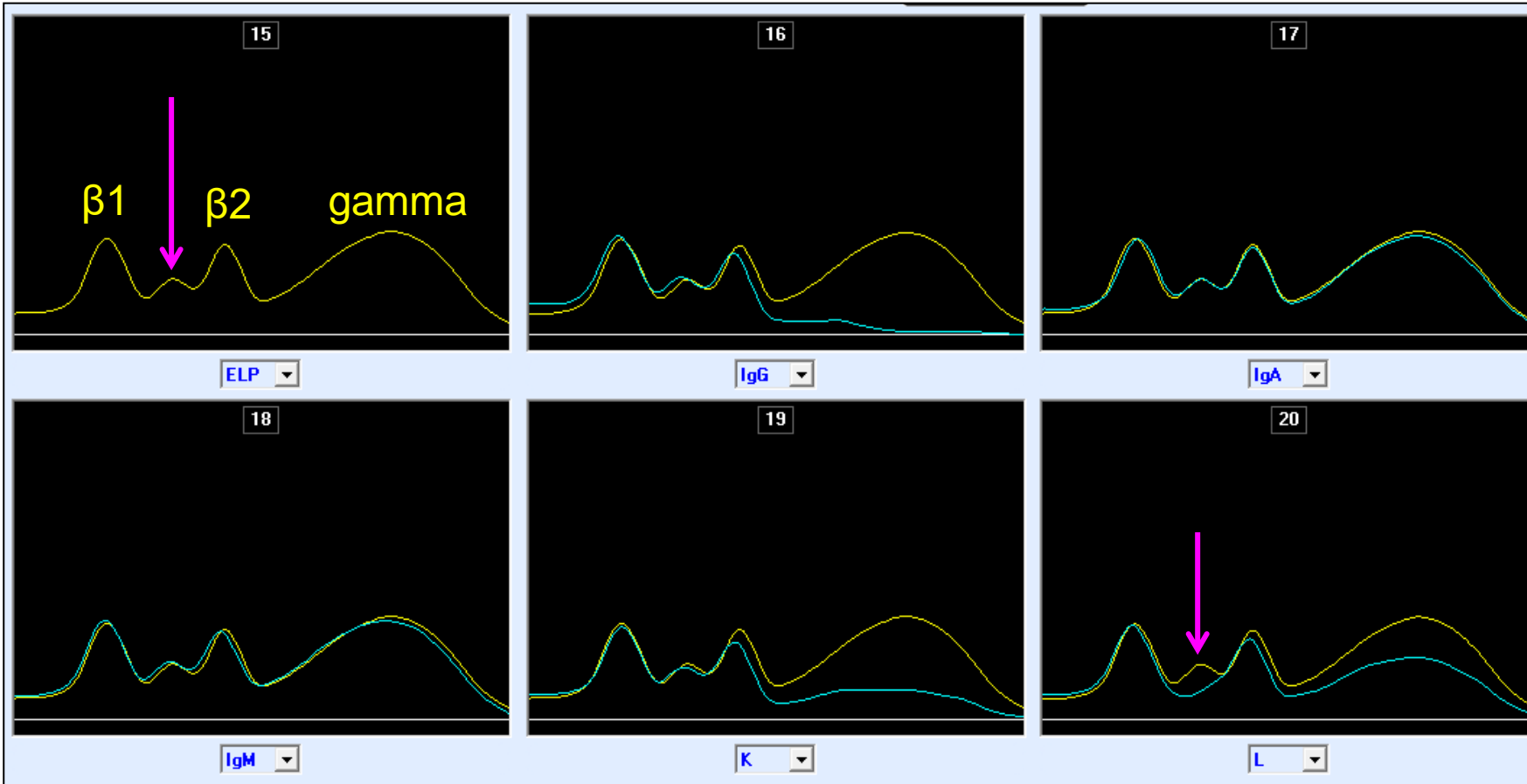
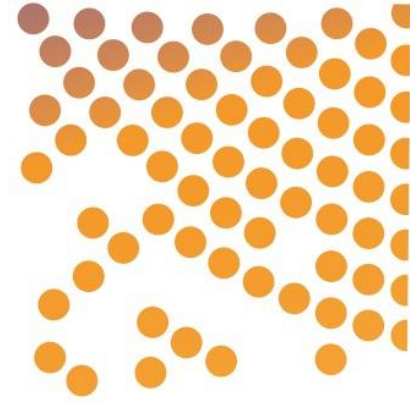
PT
65g/L

DILUCION ESTANDAR

Pico adicional en Beta-2



CASO 9: Immunotyping (zoom x4)



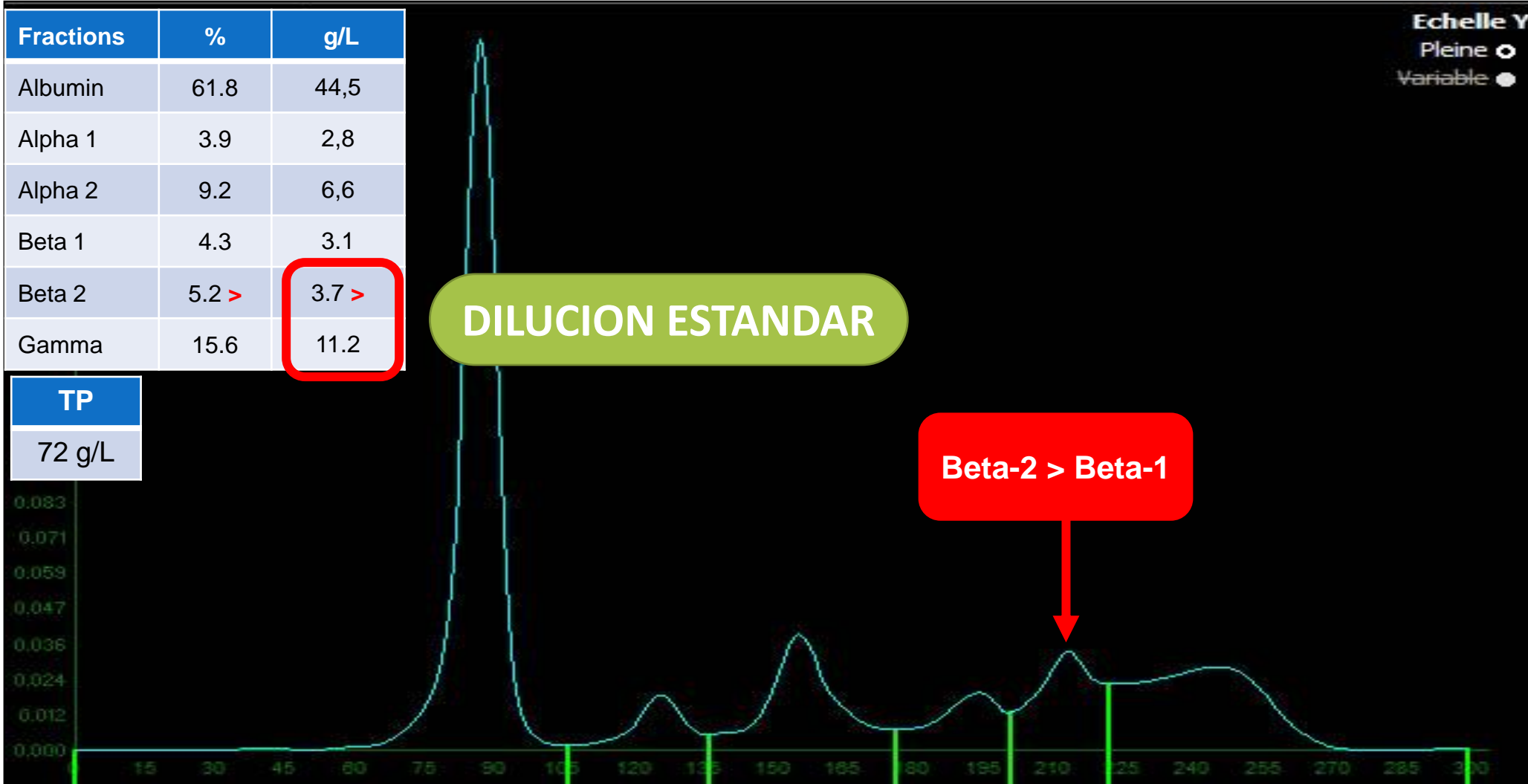
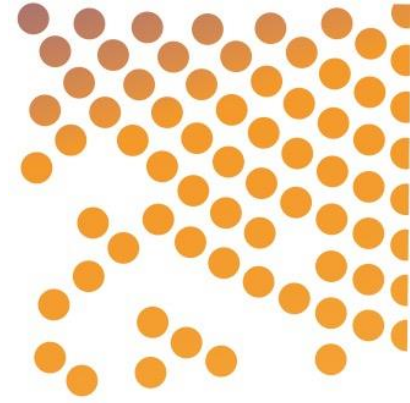
CONCLUSION:

- Cadenas livianas libres monoclonales Lambda ?
- IgD Lambda ?
- IgE Lambda ?

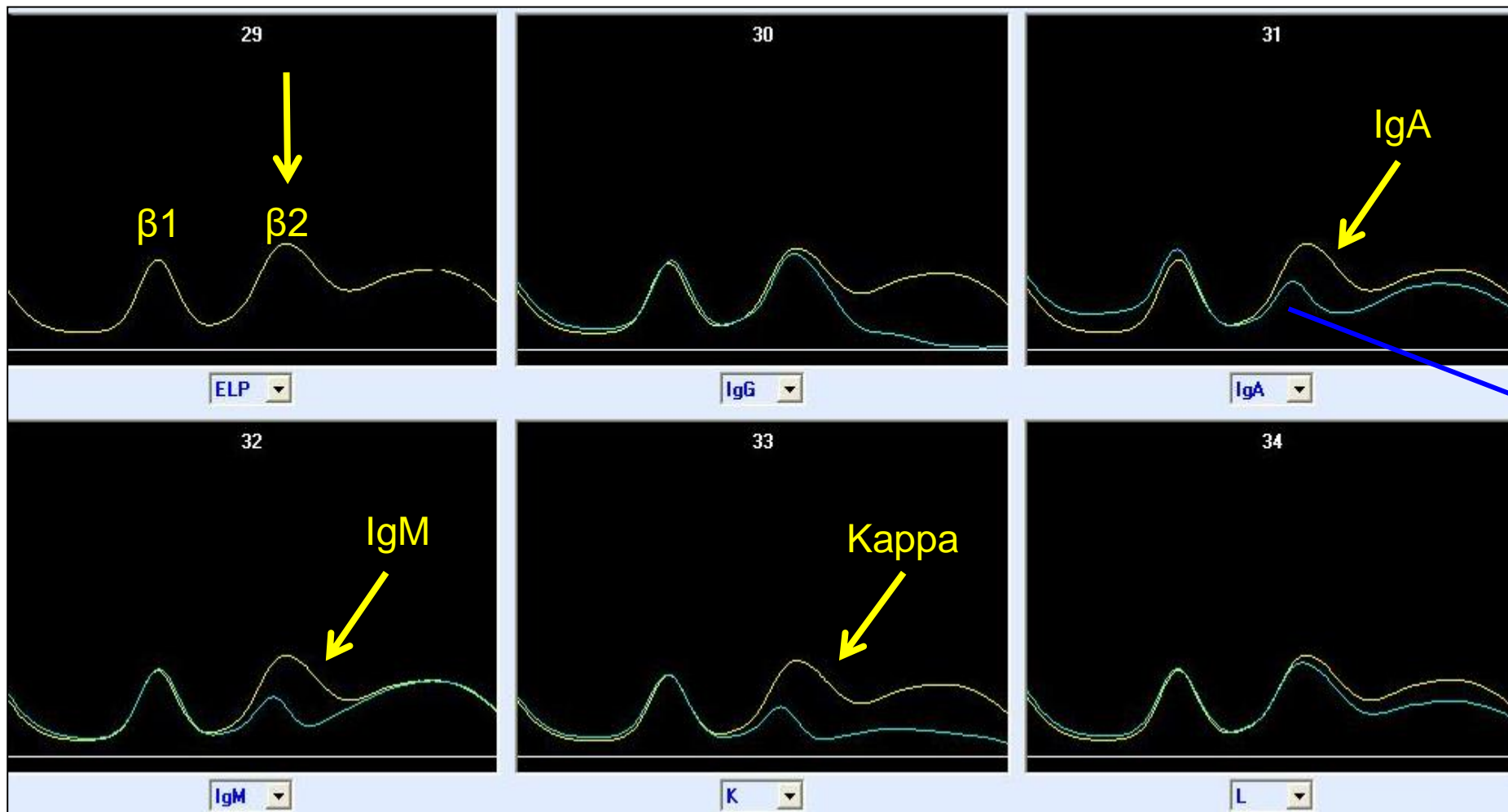
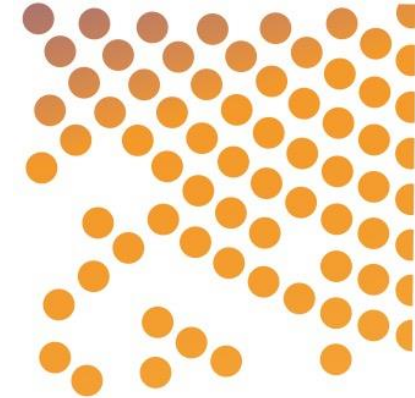


Hacer una Inmunofijación en gel de agarosa utilizando los antisueros específicos: anti-Lambda libre, anti-IgD y anti-IgE

CASO 10: Electroforesis de proteínas séricas



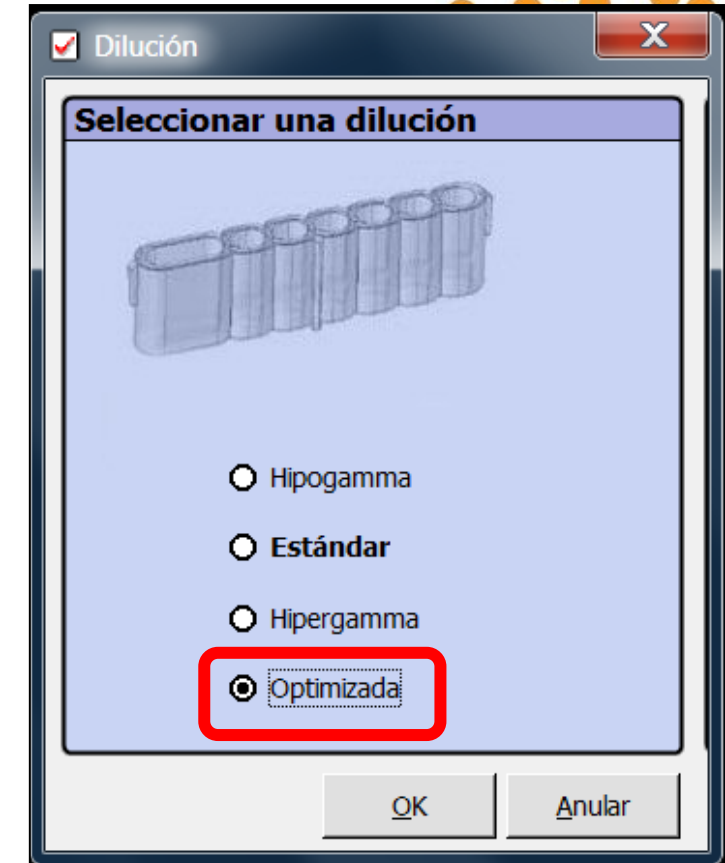
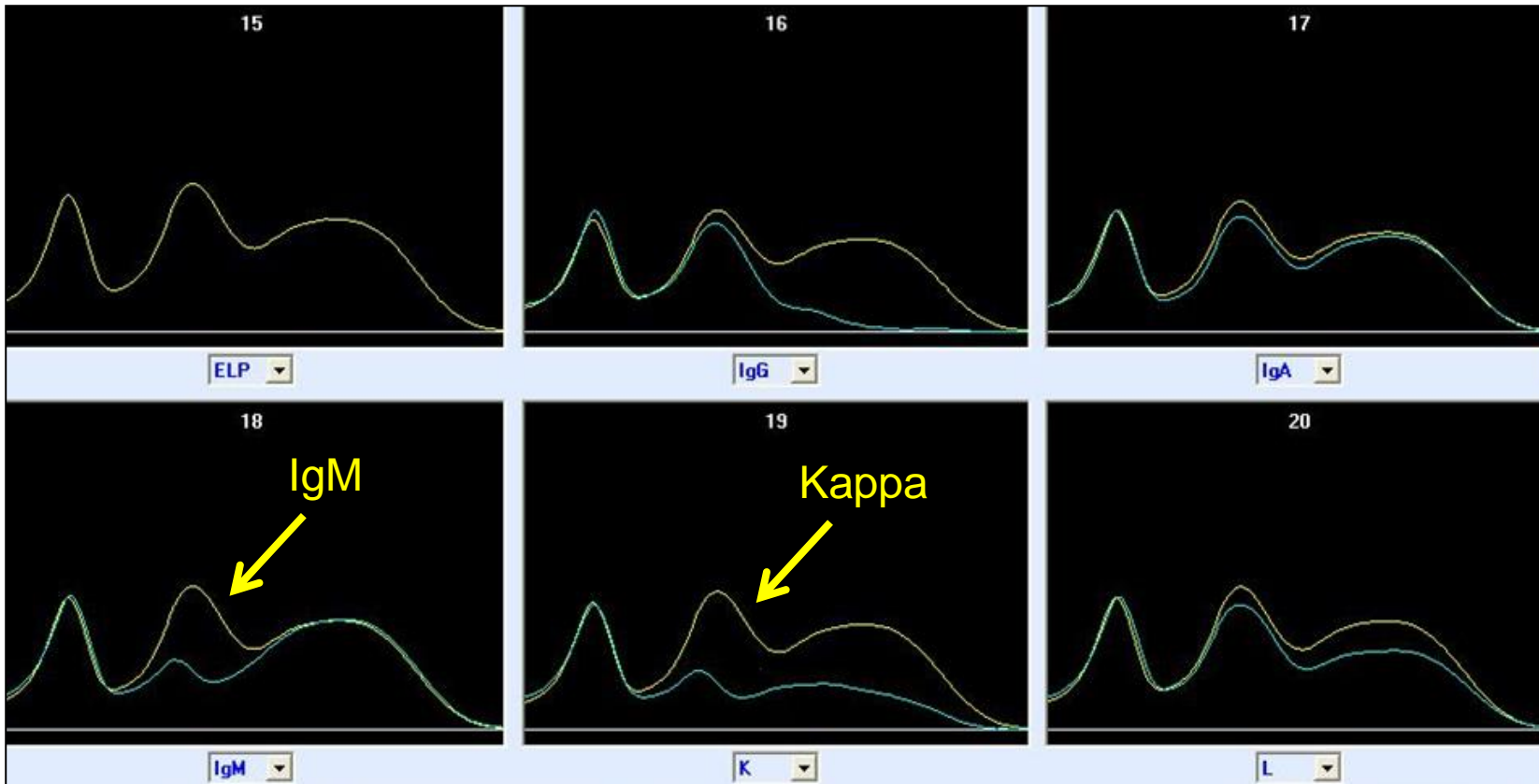
CASO 10: Immunotyping (zoom x4)



CONCLUSION: IgA Kappa o IgM Kappa ? = Reacción múltiple simultánea entre IgA e IgM

Reacción múltiple simultánea

- En algunos casos, las proteínas monoclonales adoptan una conformación particular lo que provoca reacciones simultáneas con varias cadenas pesadas (formación de inmunocomplejos...)
- La dilución optimizada cambia la relación entre el antígeno y el anticuerpo



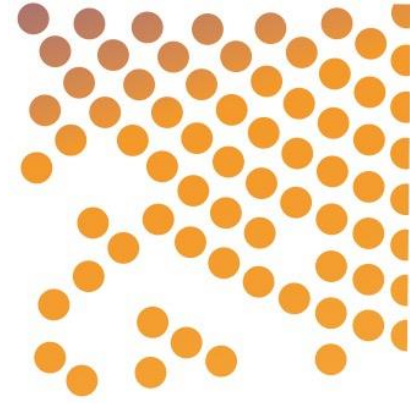
CONCLUSION: IgM Kappa

CASOS DE USUARIOS IT EN LATAM

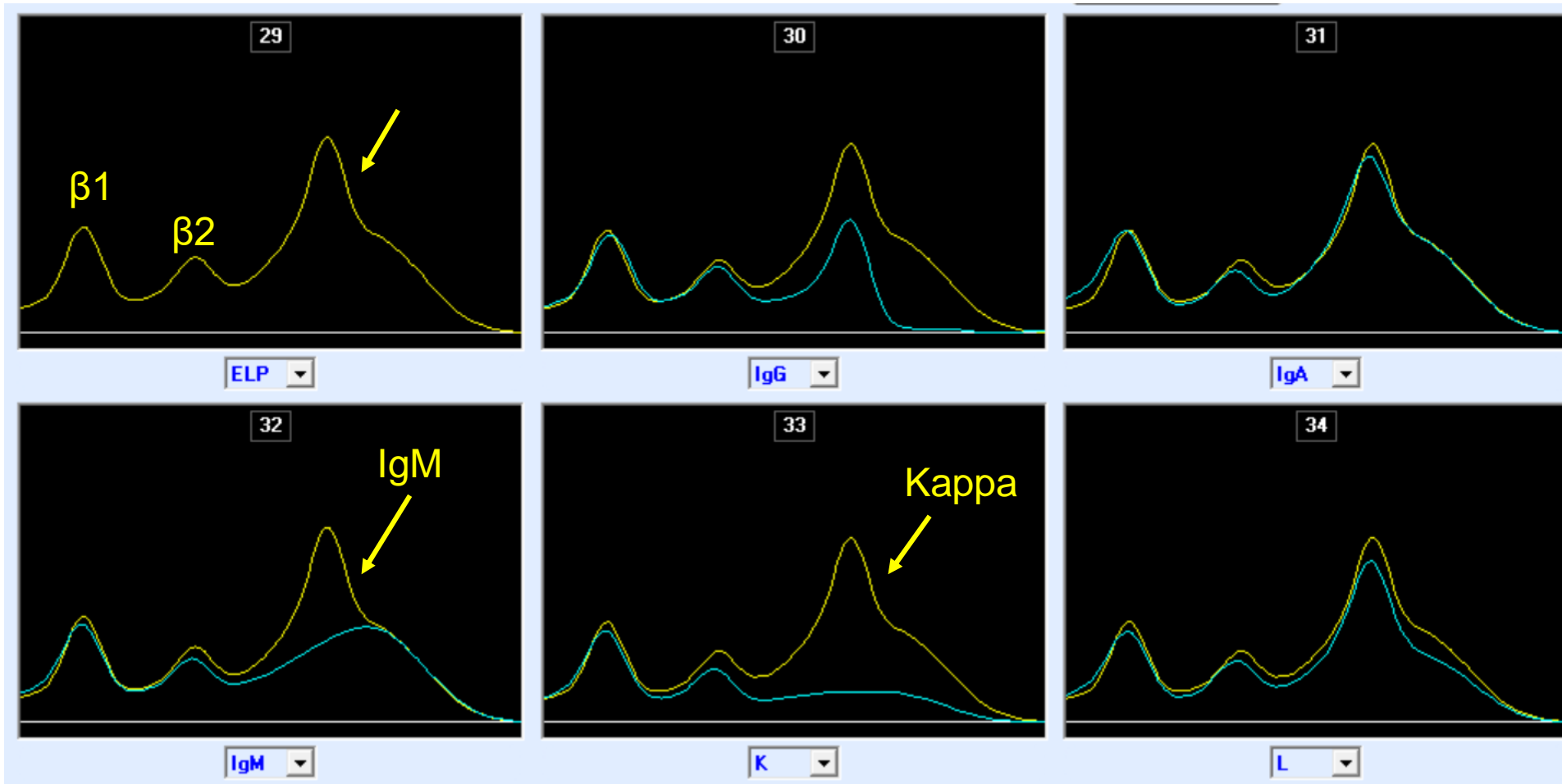
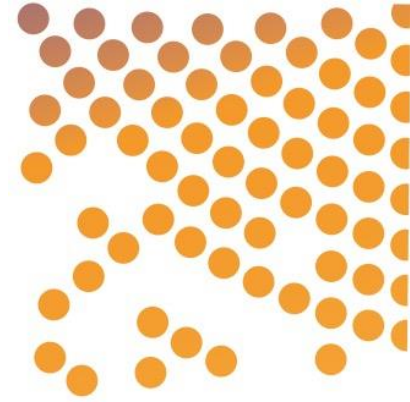
muchas
gracias



CASO 1: Electroforesis de proteínas séricas

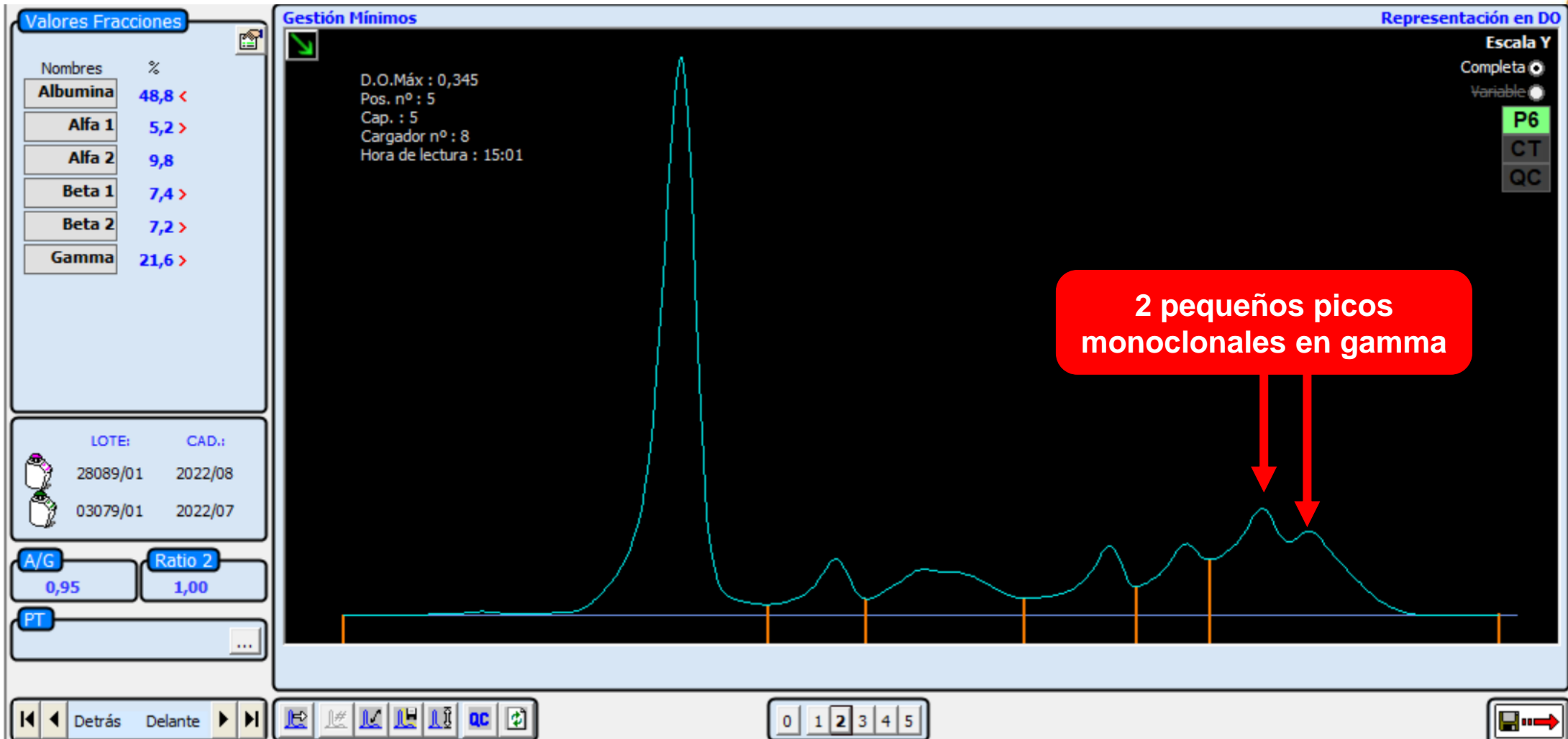


CASO 1: Immunotyping (zoom x4)

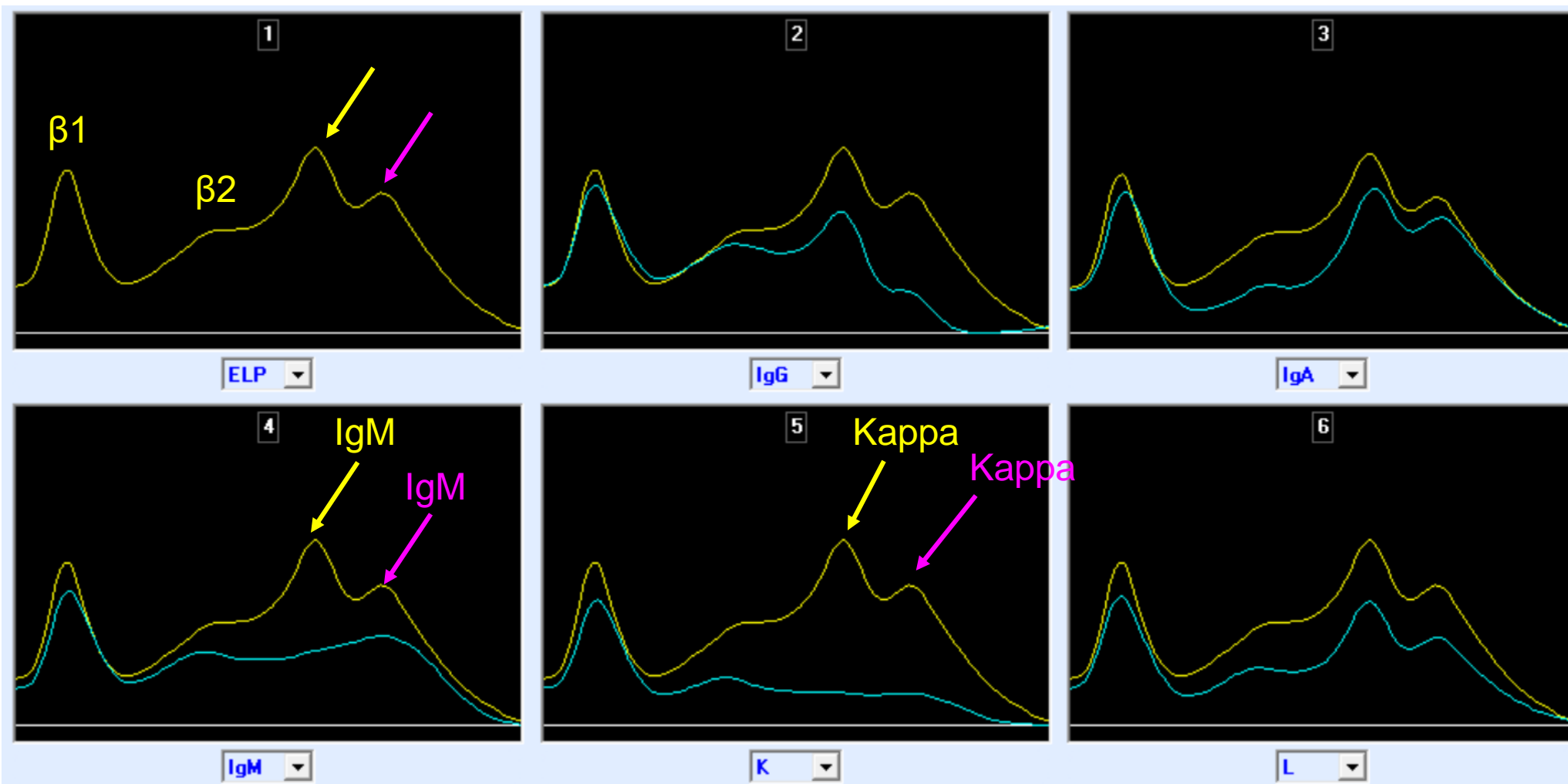
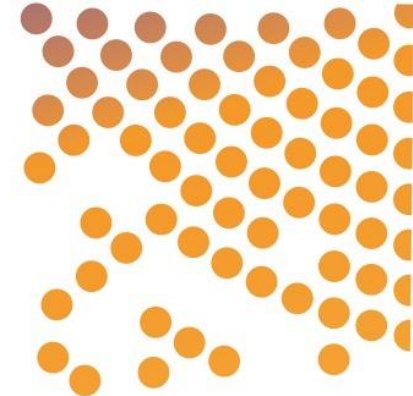


CONCLUSION: Presencia de IgM Kappa

CASO 2: Electroforesis de proteínas séricas

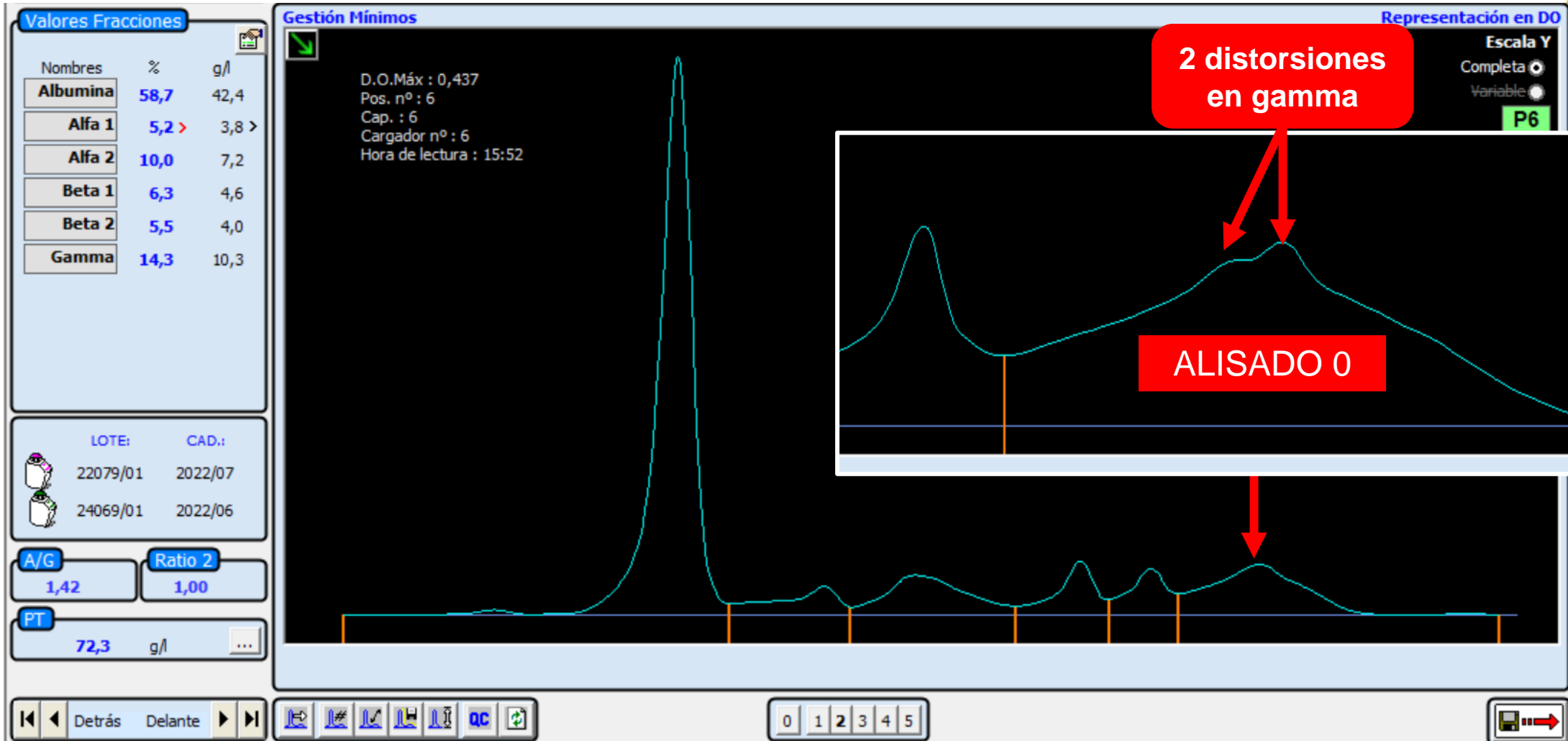


CASO 2: Immunotyping (zoom x4)

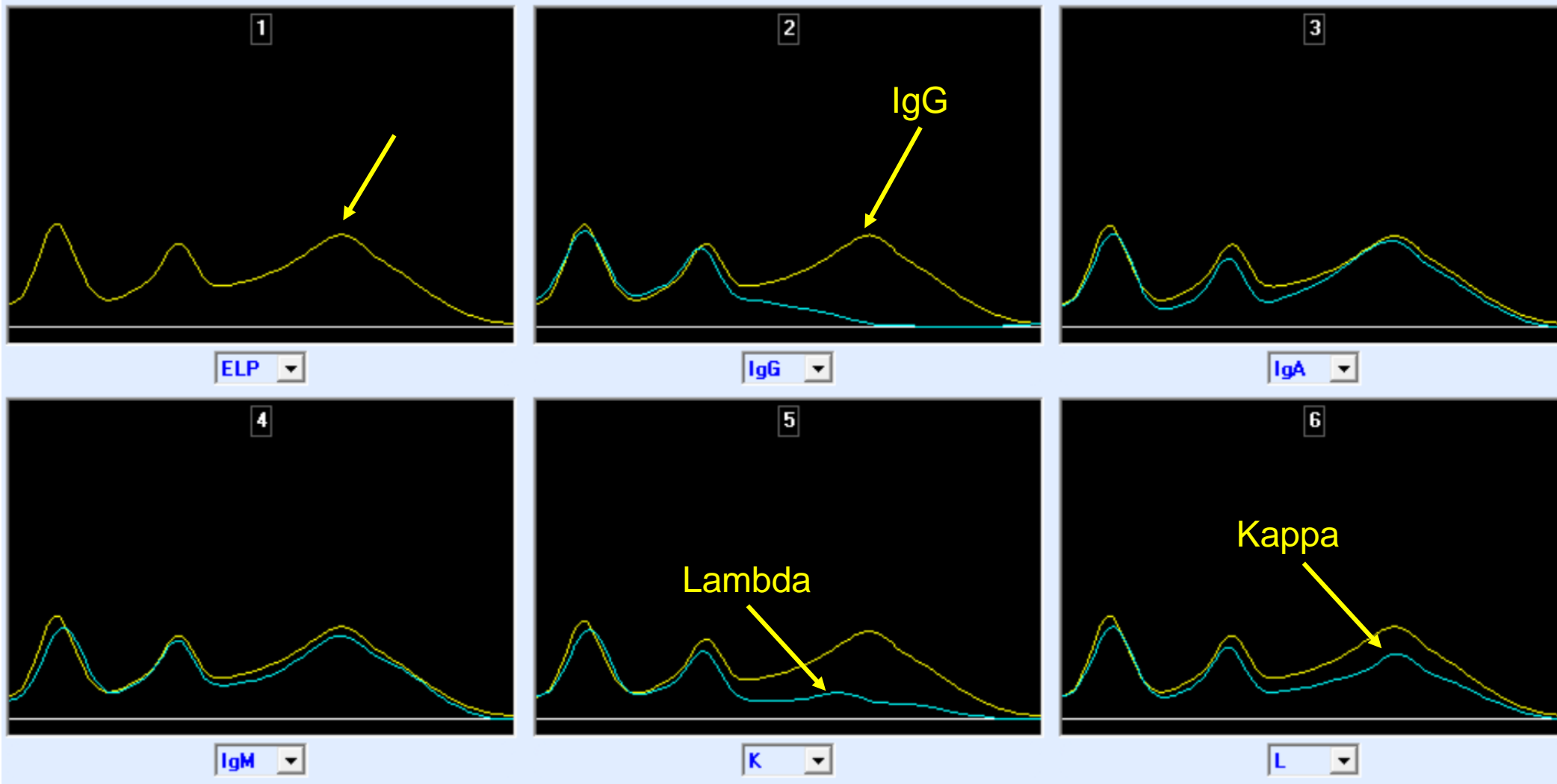
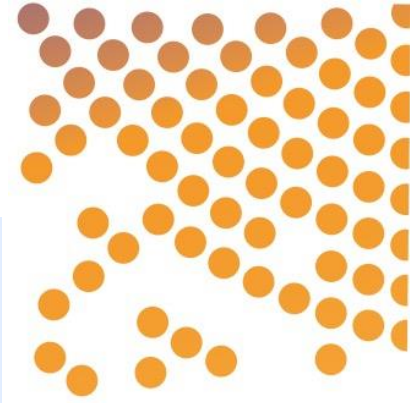


CONCLUSION: Presencia de 2 IgM Kappa → Tratar la muestra con BME o DTT

CASO 3: Electroforesis de proteínas séricas

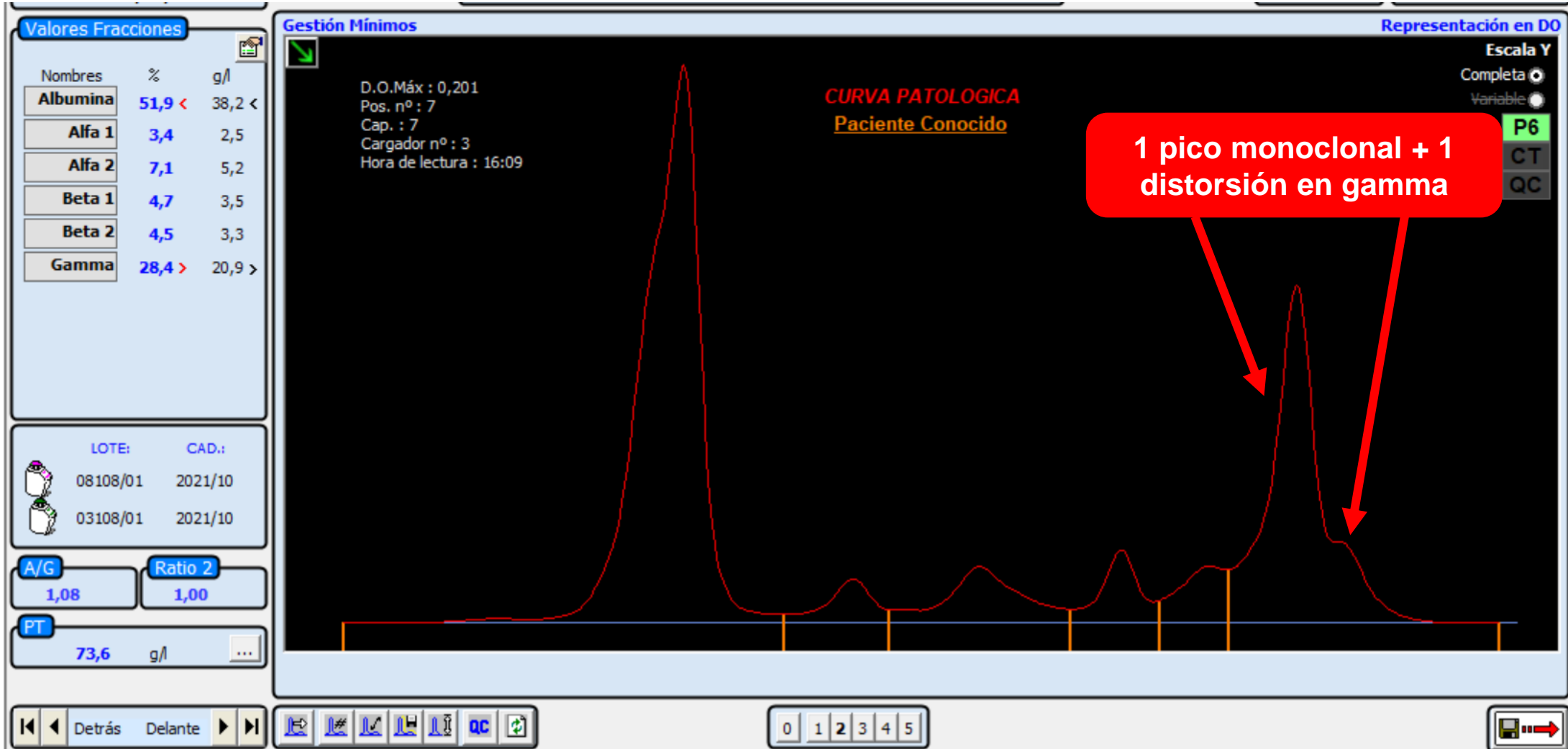


CASO 3: Immunotyping (zoom x4)



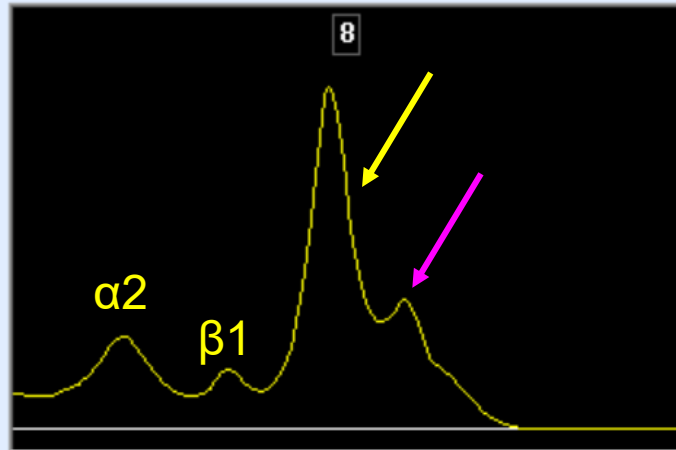
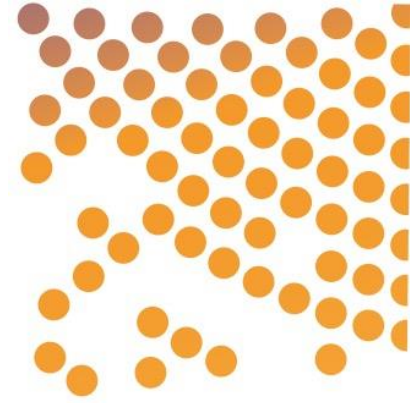
CONCLUSION: Discreta IgG Kappa + Discreta IgG Lambda

CASO 4: Electroforesis de proteínas séricas

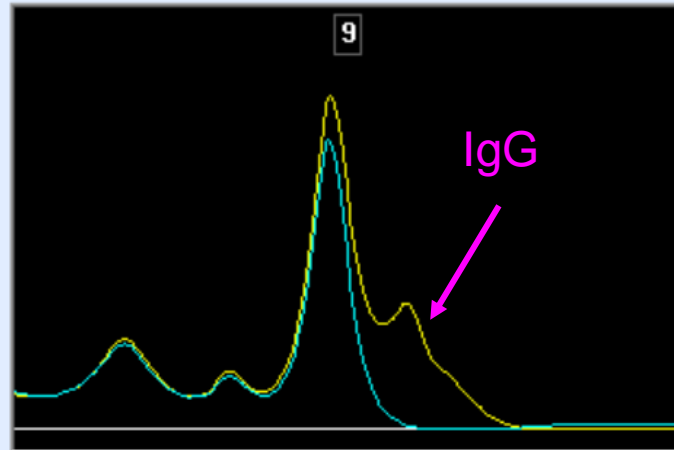


CASO 4:

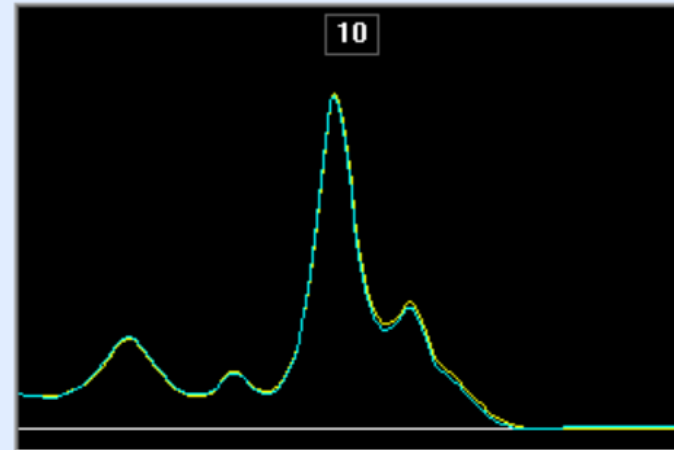
CONCLUSION: IgM Lambda + IgG Kappa + IgM Kappa



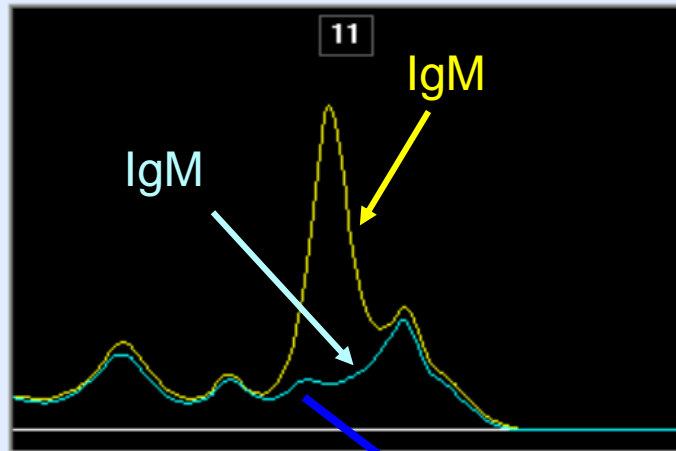
ELP



IgG

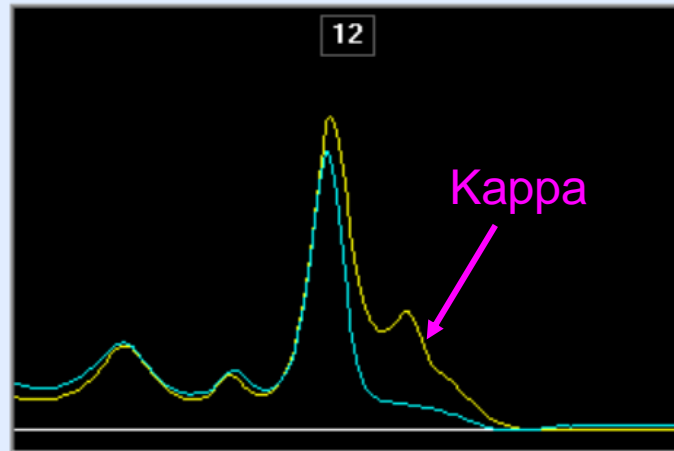


IgA

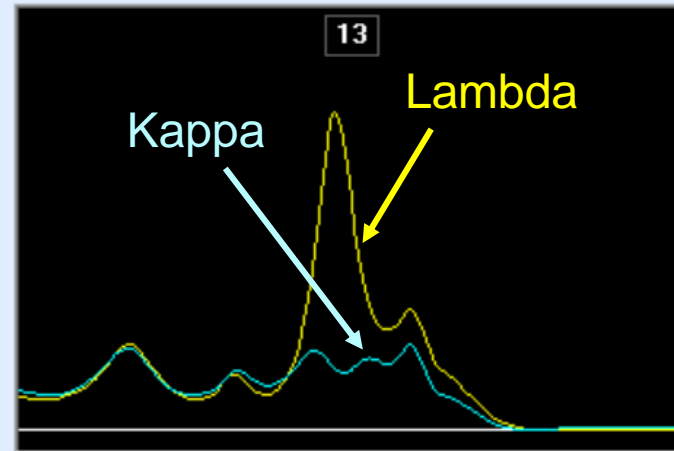


IgM

Beta 2

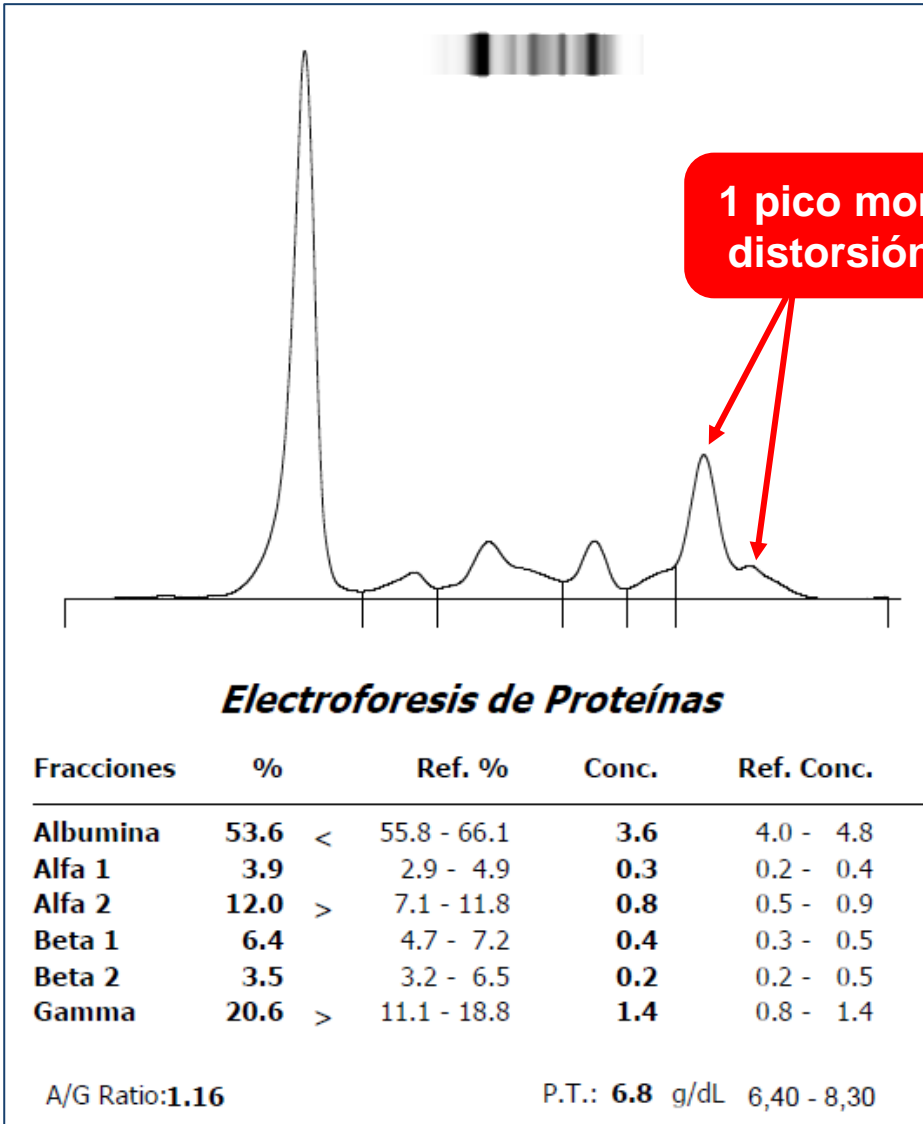
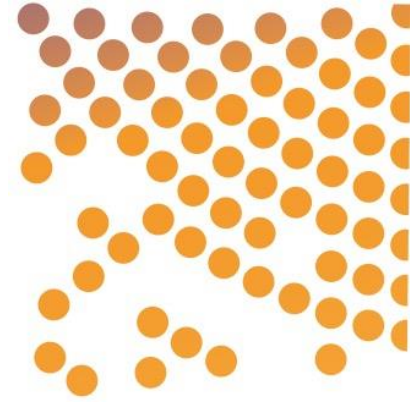


K



L

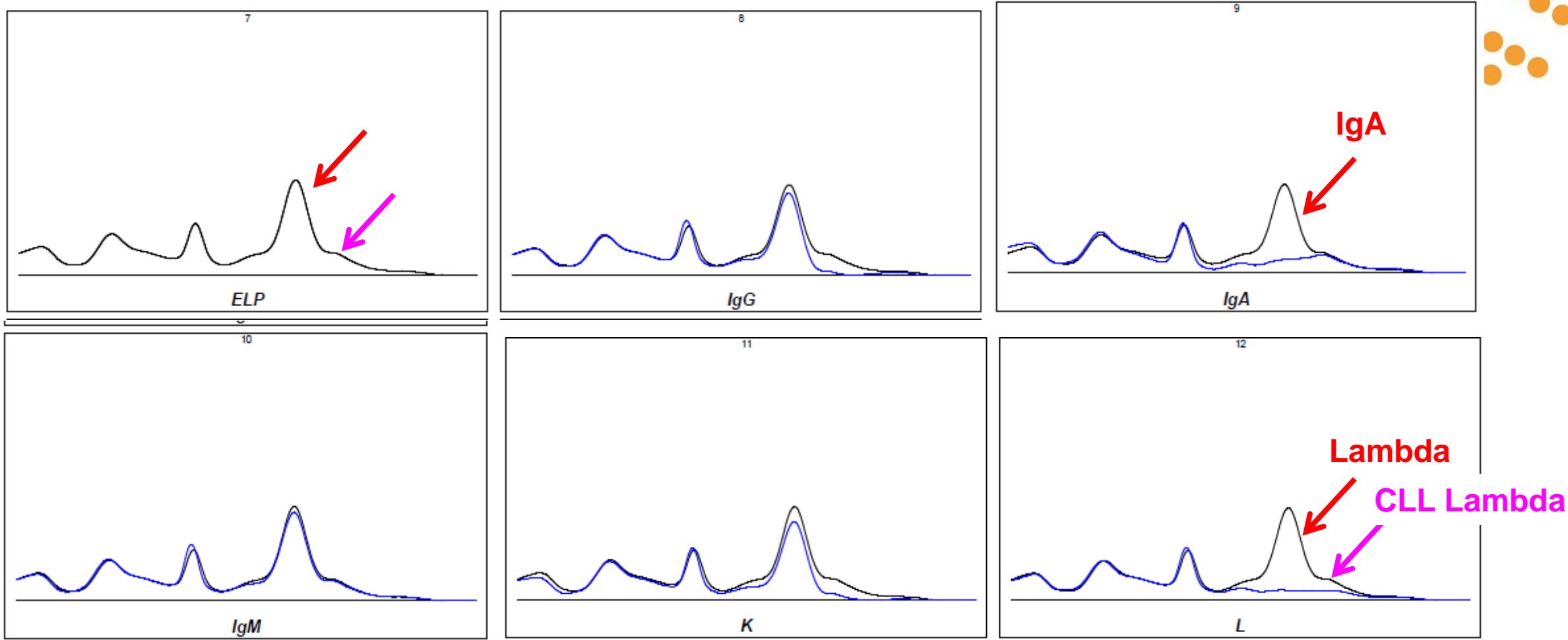
CASO 5: Electroforesis de proteínas séricas



1 pico monoclonal + 1 distorsión en gamma

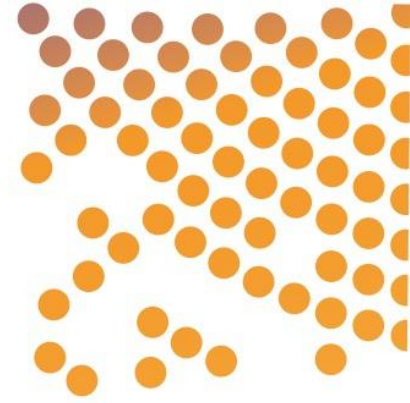
Dilución ESTANDAR

CASO 5: Immunotyping (zoom x4)

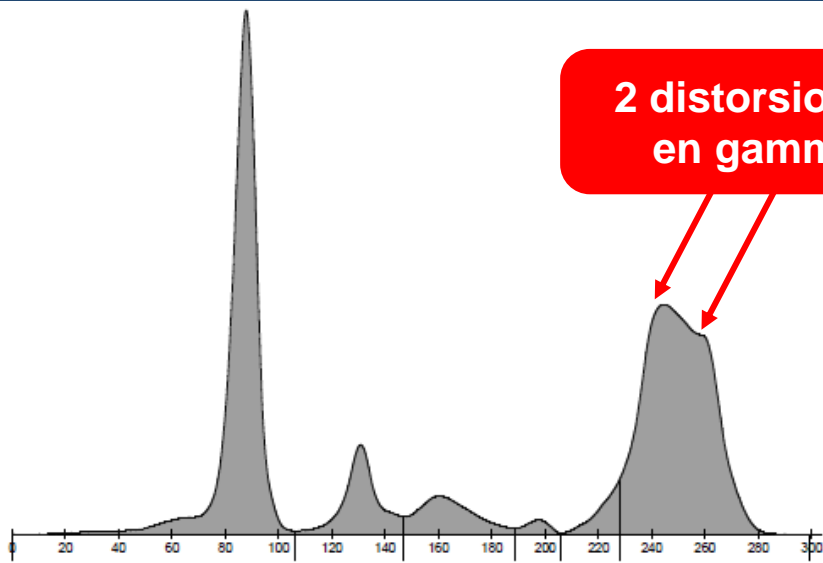


CONCLUSION: Presencia de IgA Lambda + CLL Lambda → Confirmar por IF en gel

CASO 6: Electroforesis de proteínas séricas



2 distorsiones en gamma



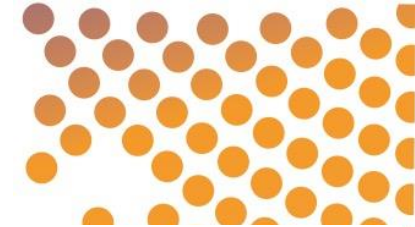
Electroforesis de Proteínas Séricas

Fracciones	%	Ref. %	g/dL	Ref. g/dL
Albumina	36.9	< 55.8 - 66.1	2.50	4.26 - 5.05
Alfa 1	7.7	> 2.9 - 4.9	0.52	0.22 - 0.37
Alfa 2	5.9	< 7.1 - 11.8	0.40	0.54 - 0.90
Beta 1	0.9	< 4.7 - 7.2	0.06	0.35 - 0.55
Beta 2	2.9	< 3.2 - 6.5	0.20	0.24 - 0.49
Gamma	45.7	> 11.1 - 18.8	3.10	0.84 - 1.43

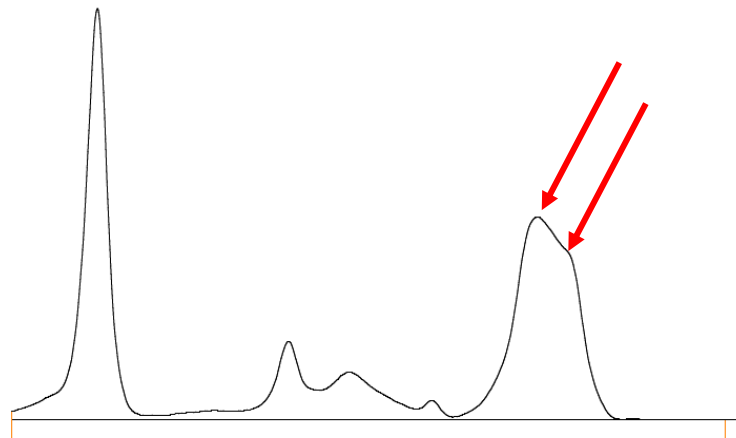
A/G: 0.58 T. P.: 6.78 g/dL

Dilución HIPERGAMMA

CASO 6: Immunotyping (zoom x4)

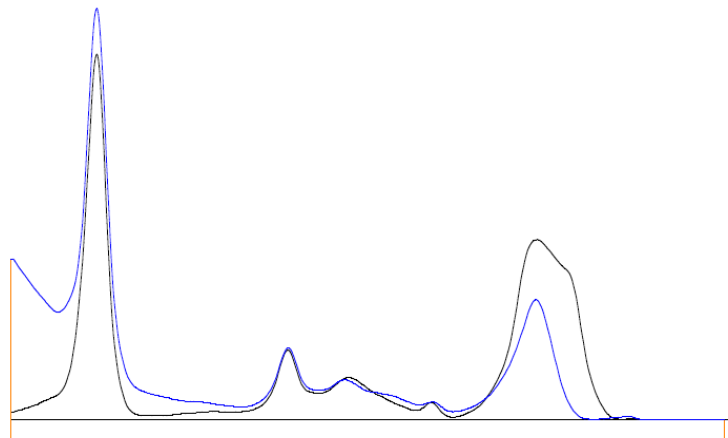


64



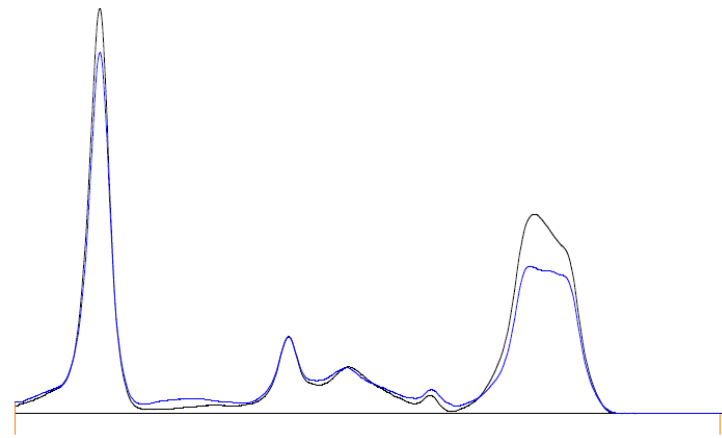
ELP

65



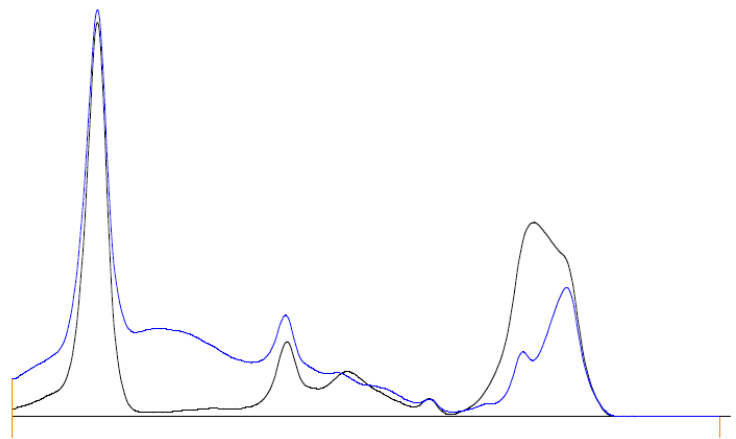
IgG

66



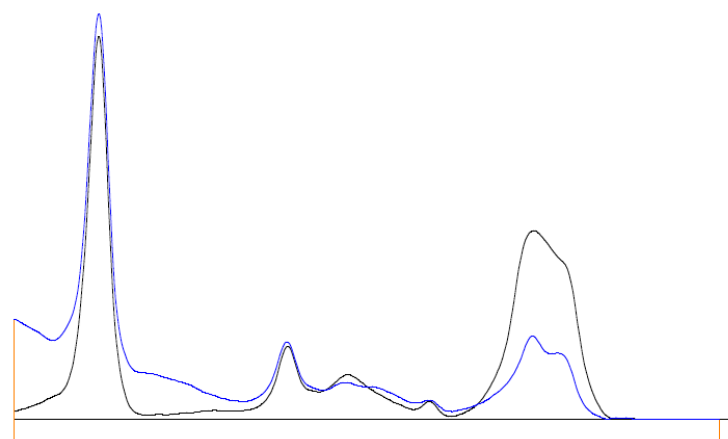
IgA

67



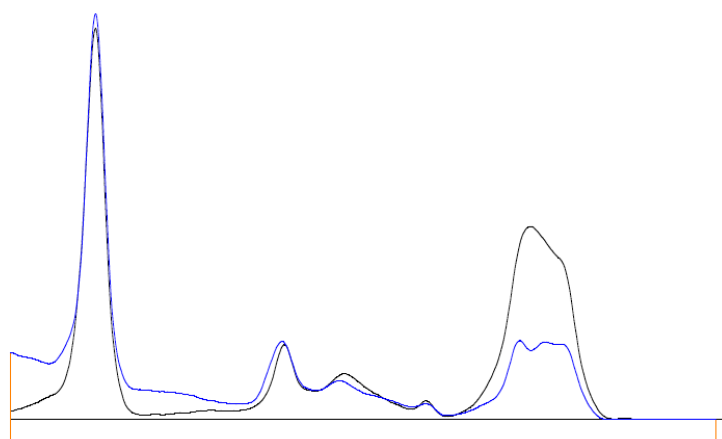
IgM

68



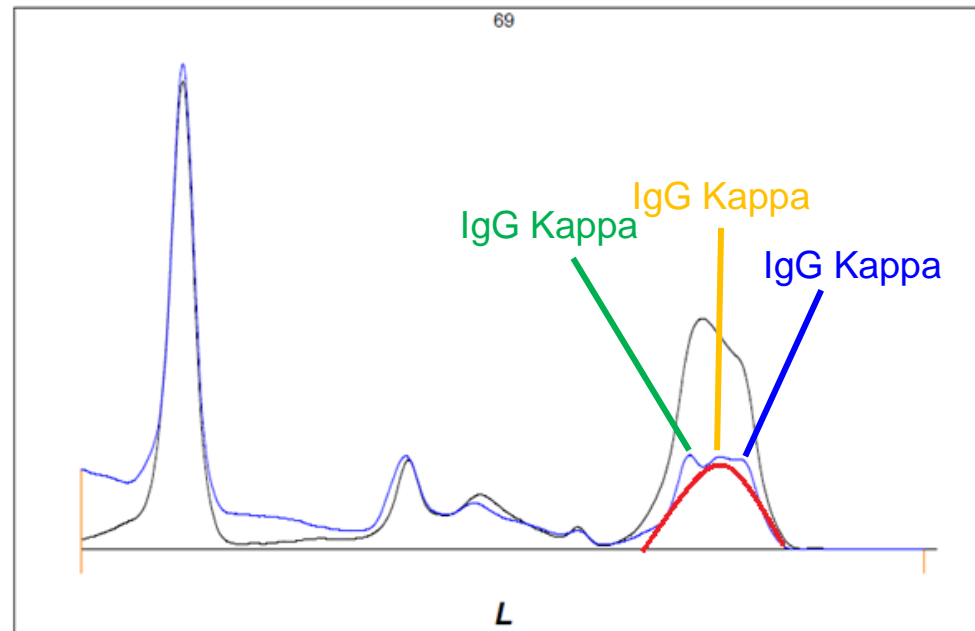
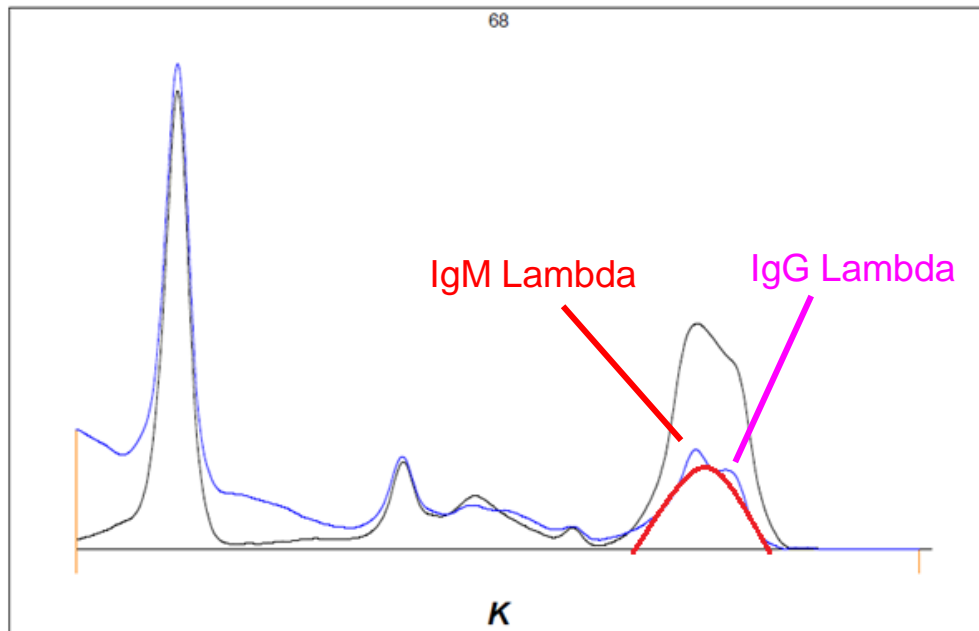
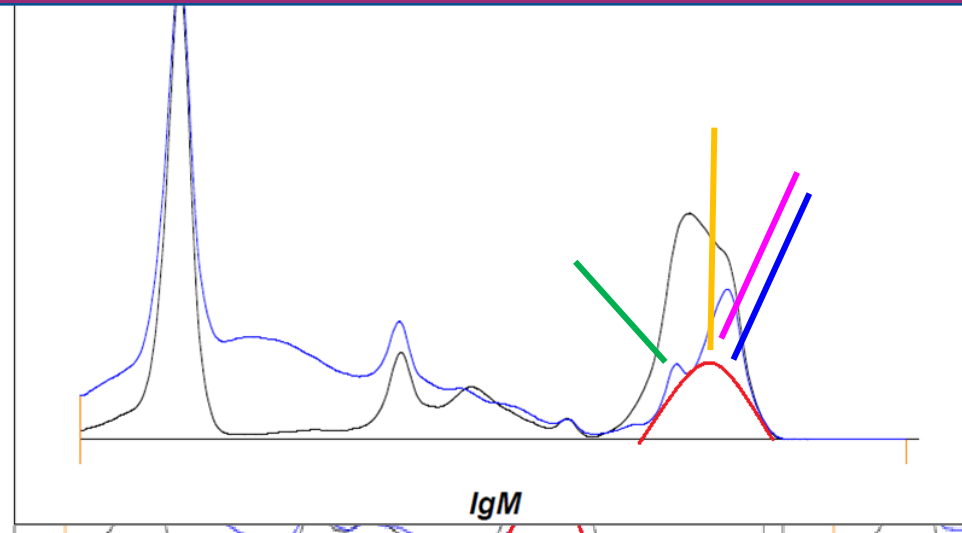
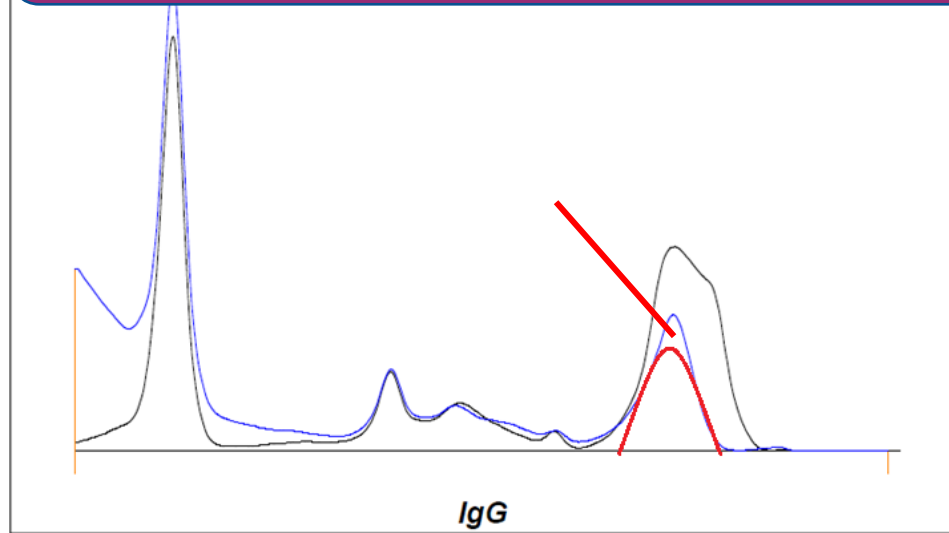
K

69



L

CONCLUSION: Aumento policlonal de IgG e IgM asociado a un perfil oligoclonal





**MUCHAS GRACIAS
POR SU ATENCION !**

Nieves SANZ

Asesora Científica - SEBIA LATAM

nsanz@sebia.com