

Inmunofijación en diferentes líquidos biológicos. Requisitos de las etapas preanalítica, analítica y posanalítica para su realización y correcta interpretación.

Immunofixation in different biological fluids. Requirements of the pre-analytical, analytical and post-analytical stages for its correct performance and interpretation.

Alejandro, ME¹⁻²; Facio, ML¹; Viniegra, J¹; García M¹; Barakian BF¹; Madalena, LB¹.

¹ Laboratorio de Proteínas del Hospital de Clínicas José de San Martín. Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

² Laboratorio de Análisis Proteicos Especializados. Centro de Hematología Pavlovsky. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

marielalejandre@hotmail.com

Fecha recepción: 18/8/2022
Fecha aprobación: 25/8/2022



LABORATORIO

HEMATOLOGÍA
Volumen 26 n° 2: xx-xx
Mayo - Agosto 2022

Palabras claves: inmunofijación, gammopatías monoclonales, remisión completa.

Keywords: immunofixation, monoclonal gammopathies, complete remission.

Fundamento

El laboratorio de proteínas utiliza métodos muy diferentes con el objeto de brindar información diagnóstica, pronóstica y de seguimiento en pacientes con cierto tipo de afecciones. Estos métodos incluyen pruebas para evaluar un conjunto de analitos en simultáneo, como el proteinograma electroforético o la inmunolectroforesis con antisueros poliespecíficos, pruebas para la cuantificación de proteínas individuales y pruebas para identificar un analito, como la inmunolectroforesis con antisueros monoespecíficos o, con mayor eficiencia, la electroinmunofijación (IFx)⁽¹⁾.

La técnica de IFx se basa en que las proteínas se separan en base a su movilidad electroforética y luego se aplica un antisuero específico para el antígeno en estudio. Donde se encuentra el antígeno y su anticuerpo homólogo, se forma una banda o zona de precipitación (de acuerdo al origen clonal del antígeno), visible luego de la tinción desarrollada.

Características preanalíticas

Es posible realizar la técnica de IFx tanto en muestras de suero como en orina y líquido cefalorraquídeo (LCR).

Muestra de suero: es la muestra sanguínea de

elección. El plasma está desaconsejado ya que contiene factores de coagulación, fundamentalmente el fibrinógeno que, por su concentración relativamente elevada (entre 2 y 4 g/L en individuos sanos), no sólo incrementa la proteinemia sino que resulta ser un interferente debido a que se lo observa como una banda homogénea en la zona γ globulina (en soportes sólidos como acetato de celulosa y agarosa) o en la zona beta-2 (en la electroforesis capilar) del proteinograma, que puede confundirse fácilmente con un componente monoclonal (CM).

Muestra de orina: se requiere orina de 24 hs de recolección debido a que la excreción de proteínas en orina no es constante. El paciente debe descartar la primera orina de la mañana y comenzar desde ese momento a juntar todas las micciones hasta la primera orina de la mañana del día siguiente y llevar la totalidad de la orina recolectada al laboratorio. Es aconsejable colocar la orina en envases de plástico vacíos de agua mineral, dejar los mismos en heladera mientras se están juntando las diversas micciones hasta su traslado al laboratorio, para su correcta conservación.

Muestra de LCR: se obtiene por punción aspiración lumbar, debe remitirse refrigerada al laboratorio y acompañada de una muestra de suero del paciente, recolectada en un lapso no mayor a cuatro horas desde la obtención del LCR, para el procesamiento en paralelo de las mismas.

Todas las muestras se procesan en el día o se conservan refrigeradas a 2-8°C hasta su procesamiento.

Características analíticas

Es posible realizar la IFx en geles de agarosa, de forma automatizada, en equipos como el HYDRASYS de Sebia o INTERLAB G-26. Se debe proceder según las instrucciones del fabricante, teniendo en cuenta variables dependiendo si se utilizan kits para realizar la IFx en suero o la IFx en muestras de orina de 24 hs de recolección. En líneas generales, el procedimiento consiste en colocar en el equipo la placa de agarosa, las muestras de los pacientes y los antisueros a ensayar, programar las diluciones deseadas para cada muestra y dar comienzo a la sucesión de los pasos técnicos que, en el lapso de una hora aproximadamente, culminarán en la resolución de cuatro IFx por cada placa de agarosa empleada. Dichos pasos incluyen la siembra de las muestras, la corrida electroforética, la aplicación de antisueros y su respectiva incubación y el proceso de lavado, coloración, decoloración y secado final del gel.

Algunos laboratorios cuentan además con la posibilidad de realizar IFx mediante técnica manual, en geles de acetato de celulosa gelatinizado, utilizando tinción de Coomassie para IFx en muestras de suero y tinción ultrasensible de plata coloidal para IFx en muestras de LCR y orina, siendo esta coloración la que permite trabajar líquidos biológicos de baja concentración de proteica, sin necesidad de concentración previa de los mismos⁽²⁾.

La siguiente tabla nos muestra los diversos reactivos, y las instrucciones de uso y conservación, necesarios para la realización de IFx mediante procedimiento manual.

Reactivo	Composición	Instrucciones de uso	Conservación
Acetato de celulosa de 5.7x14 o de 2.5x17. Marca Cellogel o PROGEL	Tiras de acetato de celulosa gelatinizado embebidas en solución conservante de alcohol metílico al 40%	Embeber en <i>buffer</i> veronal sódico de corrida durante 10 minutos y usar	Temperatura ambiente. Estable hasta fecha de vencimiento indicada en el envase
Azul de bromofenol	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$	Punta de espátula de la droga sólida, diluida en alcohol etílico	Temperatura ambiente. Estable hasta fecha de vencimiento indicada en el envase
Coloración con plata coloidal	Ver preparación en a) coloración de plata coloidal	Listo para usar	Temperatura ambiente
Coloración con Coomassie Brilliant Blue R250	Ver preparación en b) Coloración de Coomassie	Listo para usar	Temperatura ambiente
Antisueros comerciales marca HELENA o SEBIA o BIOCIENTIFICA	Antisueros mono-específicos	Listo para usar	Conservar en congelador hasta su apertura y posteriormente en heladera a 4°C.

a) Coloración de plata coloidal

- Reactivo ferroso

Para 500 ml:

Reactivo	Cantidad
Sulfato ferroso	3,95 g
Citrato de sodio	8,5 g
Tween 20 0.25%	1,25 ml
Agua destilada	csp

Nota: El reactivo se prepara y conserva a temperatura ambiente. Se fracciona el contenido en 20 frascos de 25 ml color caramelo y se almacena al abrigo de la luz, ya que el reactivo es fotosensible. Se utiliza 1 frasco para cada coloración.

- Reactivo de plata

Para 100 ml:

Reactivo	Cantidad
Nitrato de plata	19,5 g
Agua destilada	csp

Nota: El reactivo se prepara y conserva a temperatura ambiente. Se fracciona el contenido en 4 frascos de 25 ml color caramelo y se almacena al abrigo de la luz, ya que el reactivo es fotosensible. Se utilizan 5-6 gotas para cada coloración.

- Reactivos de contracolor para la tinción con plata

Para 1 litro:

Reactivo 1	Cantidad
Acido oxálico	12 g
Agua destilada	csp
Reactivo 2	Cantidad
Tricloruro férrico	48 g
Agua destilada	csp
Reactivo 3	Cantidad
Potasio ferricianuro	11 g
Agua destilada	csp

Nota: Los reactivos se preparan y conservan a temperatura ambiente en frascos de 1 litro color caramelo. Para la contra-coloración se mezclan 15 ml de cada reactivo en el momento que se va a utilizar.

- Fijador

Para 1 litro:

Reactivo	Cantidad
Ácido sulfosalicílico	50 g
Ácido tricloroacético	110 g
Agua destilada	csp

Nota: El reactivo se prepara y conserva a temperatura ambiente en un recipiente de plástico

b) Coloración con Coomassie

Para 500 ml:

Reactivo	Cantidad
Coomassie Brilliant Blue R250	5 g
Ácido acético glacial (Mallinckrodt)	25 ml
Alcohol etílico (uso medicinal)	237,5 ml
Agua corriente	237,5 ml

Nota: El reactivo se prepara y conserva a temperatura ambiente, en una botella de alcohol vacía y seca. Una vez realizada la coloración, el reactivo se recupera en la misma botella. Posee una vida media de 3 meses.

Procedimiento para realizar IFx mediante técnica manual en gel de acetato de celulosa gelatinizado:

- Se realiza según el método de Pizzolato y col.⁽³⁾.
- Se cumplen todas las precauciones de bioseguridad en el procedimiento.
- Se preparan y ordenan las muestras a ser analizadas de acuerdo a las listas de trabajo.
- Tomar con una pinza el extremo las tiras de acetato de celulosa gelatinizado que se encuentran en solución de metanol al 40% y eliminar el exceso de metanol, absorbiendo las tiras entre dos hojas de papel de filtro.
- Sumergir las tiras en el *buffer* de corrida (veronal sódico) durante 5-10 minutos como mínimo. Las tiras que no se utilicen volverlas a la solución conservante.
- Eliminar el exceso de *buffer* con papel de filtro como en el paso anterior y rotular las tiras con marcador indeleble.
- Cargar la cuba de electroforesis con el *buffer* y colocar el soporte de plástico con los puentes de papel de filtro.

- Extender las tiras sobre el soporte de plástico en la cuba electroforética, con la superficie activa del gel hacia arriba (corresponde a la superficie opaca de la tira).

- En una placa que contenga gotas del colorante azul de bromofenol disecadas (para evitar diluciones de las muestras) colocar una gota de los sueros, LCR u orinas a sembrar, sobre cada una de las marcas de colorante seco. Éste se une a la albúmina de la muestra coloreándola de azul y actuando como marcador de frente de corrida (por ser la albúmina la proteína más anódica).

- Sembrar las muestras en seis calles, una calle control y las otras cinco calles donde se ensayarán cada antisuero monoespecífico en cuestión.

1-Fijación de sueros: se siembra en la primer calle el suero puro de cada paciente y ésta será la calle control a la que se le agregará el fijador. En el resto de las calles en las que se ensayarán los distintos antisueros monoespecíficos se sembrará una dilución del suero, de manera tal que se logre la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo, por llegar a la zona de equivalencia.

2-Fijación de orinas: se siembra en la primera calle la orina pura de cada paciente y ésta será la calle control a la que se le agregará el fijador. En el resto de las calles en las que se ensayarán los distintos antisueros monoespecíficos, se sembrará la orina pura o una dilución de la misma, de manera tal que se logre la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo, por llegar a la zona de equivalencia.

- Efectuar la siembra de las muestras en cuestión, de acuerdo al esquema dispuesto y utilizando el sembrador semimicro. ubicando la misma en el cátodo (polo negativo).

- Conectar la cuba a la fuente de poder para efectuar la migración electroforética.

Condiciones de corrida: a voltaje constante de 180 voltios (3-5 mA/ tira), se genera aproximadamente 1 mA por centímetro de ancho de tira. Duración de la corrida en estas condiciones: alrededor de 30 minutos.

- Se interrumpe la corrida y se agrega el antisuero correspondiente en la zona de interés a investigar.

Nota: para la calle control se utiliza solución fijadora. Dejar difundir los antisueros durante 15 minutos en cámara húmeda.

a) Lavado y coloración de tiras de IFx en suero

- Lavar las tiras con solución fisiológica y agitación.

Se realizan 6 lavados de 15 minutos cada uno. El tiempo total de lavado debe ser de 1.5 hs como mínimo.

- Una vez finalizado el lavado colocar las tiras en el colorante *Coomassie brilliant blue*, durante 5 minutos.

- Decolorar con 2 baños (de 15 minutos cada uno) de decolorante (mezcla etanol-ácido cítrico-agua) para obtener una clara visualización de las bandas de precipitación (de color azul-violáceo) sobre un fondo claro.

- Realizar la evaluación cualitativa final en conjunto con los antecedentes del paciente^(4,5).

b) Lavado y coloración de tiras de IFx en LCR y orina

- Lavar las tiras con solución fisiológica y agitación. Se realizan 6 lavados de 15 minutos cada uno. El tiempo total de lavado debe ser de 1.5 hs como mínimo.

- Luego lavar las tiras con agua destilada y agitación para eliminar la solución fisiológica que impregna las tiras. Se realizan 5 lavados de 15 minutos cada uno. El tiempo total del lavado debe ser de 1 hora y 15 minutos como mínimo.

- Teñir las tiras con la técnica de coloración argéntica y agitación constante, hasta visualización de bandas. El reactivo de coloración con plata se prepara en el momento. Se mezclan 25 ml de reactivo ferroso más 5-6 gotas de reactivo de plata.

- Se sacan las tiras del colorante y se colocan en agua destilada con agitación

- Se procede a la evaluación cualitativa inicial junto con la corrida control.

- Luego se realiza la contra-coloración según la técnica de Berson (mezcla de cloruro férrico, ferricianuro de potasio y ácido oxálico) que aumenta 10 veces la sensibilidad de la coloración, preparando la mezcla en el momento. Se sumergen las tiras unos segundos hasta obtener la visualización de las fracciones proteicas (de color azul) sobre un fondo claro.

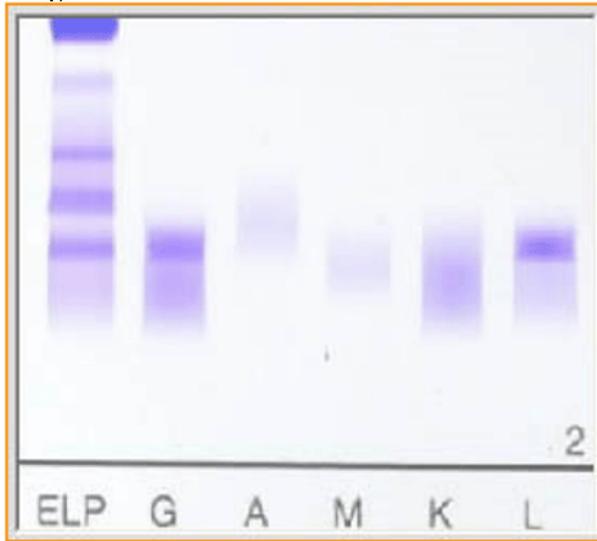
- Realizar la evaluación cualitativa final en conjunto con los antecedentes del paciente⁽⁵⁾.

Utilidad clínica

La IFx se utiliza para identificar proteínas particulares, como un CM, a través de conocer su tipo de cadena pesada y liviana (Figura 1) o para identificar interferencia como el fibrinógeno, cuando se observa la presencia de una banda homogénea en la zona

β - γ globulina en el proteinograma electroforético de control y se hace necesario descartar la presencia de un CM.

Figura 1. Paciente con un CM en suero de tipo IgG-lambda, tipificado por IFx automatizada en gel de agarosa.



También puede utilizarse como prueba cualitativa para determinar la presencia de una proteína no cuantificable por inmunoensayos, como la haptoglobina en la hemoglobinuria paroxística nocturna^(4,5). Es especialmente apta para resolver casos difíciles, como por ejemplo:

- Establecer la identidad inmunológica de gammapatías biclonales.

- Establecer la identidad inmunológica de CM de baja concentración.
 - Definir la remisión completa de la enfermedad, dependiente de confirmar la desaparición por IFx del CM original del paciente, gracias a la terapia aplicada.
 - Definir patrones de oligoclonalidad en la región de las γ -globulinas, como las bandas oligoclonales que suelen aparecer en el LCR de individuos con esclerosis múltiple.
 - Detectar interferencia que aparecen en las corridas electroforéticas como consecuencia del uso de anticuerpos monoclonales terapéuticos, por ejemplo en pacientes con Mieloma Múltiple (MM)⁽⁶⁾, o por artefactos que responden a su unión a proteínas plasmáticas, como la albúmina, que los transporta en sangre.
 - Estudiar los perfiles electroforéticos atípicos en pacientes con MM sometidos a trasplante autólogo de médula ósea (TAMO), permitiendo detectar la presencia y estudiar la identidad inmunológica de múltiples bandas homogéneas (bandas oligoclonales) pos-TAMO (marcador de buen pronóstico) y establecer la clasificación adecuada según la guía de criterios de respuesta al tratamiento aplicado⁽⁷⁾.
- Finalmente, y en base a lo antes mencionado, resulta fundamental para la interpretación adecuada de los resultados de la IFx, que el bioquímico tenga conocimiento del estado general del paciente en el momento de la toma de muestra, siendo aconsejable contar con los datos del tratamiento realizado y la medicación que recibe.

Conflictos de interés: Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Whicher JT. Immunofixation on cellulose acetate is more efficient than immunoelectrophoresis for detection of paraproteins. *Clin Chem.* 1983;29(2):402-3.
2. García M, Madalena L, Bragantini G et al. Electroinmunofijación de orinas sin concentrar por coloración con metales pesados. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 1996;30 (3):215-20.
3. M. Pizzolato, F. Goñi, R. Salvarezza. Immunofixation on cellulose acetate: an improved screening method for monoclonal immunoglobulines. *Inmunological Methods.* 1979;26,365.
4. Gurmukh Singh. The Ins and Outs of Reporting SPEP Findings. *Ask the Expert: May 2021. Clinical Laboratory News.* 2021.
5. García M, Madalena L, Gasparini S, Bresciani P, Alejandre M, Facio ML. Módulo 2: Buenas prácticas en el Laboratorio de Proteínas. Capítulo 4. Proceso analítico. 4.8. Métodos de identificación de proteínas. *El laboratorio de proteínas: conceptos sobre calidad analítica y buenas prácticas.* Editorial Eudeba. 2017.157-164.
6. Murata K, McCash S, Carroll B et al. Treatment of multiple myeloma with monoclonal antibodies and the dilemma of false positive M-spikes in peripheral blood. *Clin Biochem.* 2018. Jan;51:66-71.
7. Alejandre ME, Madalena LB, Pavlovsky MA et al. Oligoclonal bands and immunoglobulin isotype switch during monitoring of patients with multiple myeloma and autologous hematopoietic cell transplantation: a 16-year experience. *Clin Chem Lab Med.* 2010; 48(5):727-31.



Atribución – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original. Esta licencia no es una licencia libre.