

Inmunofijación en suero

Código SCPC (Sociedad Colombiana de Patología Clínica): 60700. **Código CUPS (Codificación Única de Procedimientos en Salud):** 906819. **Sección:** Inmunología. **Nivel de complejidad:** Alta. **Metodología:** electroforesis. **Sinónimos:** inmunoelectroforesis.

Definición

La inmunofijación en suero consiste en la detección, mediante electroforesis alcalina en gel de agarosa y uso de anticuerpos, de proteínas monoclonales en suero. Las proteínas migran en la electroforesis y se inmunofijan con antisueros de diferentes especificidades: anti-gamma, para la detección de inmunoglobulina G (IgG); anti-alfa, para inmunoglobulina A (IgA); anti-mu, para inmunoglobulina M (IgM); anti-lambda, para cadenas ligeras lambda, y anti-kappa, para cadenas kappa. Posterior a la inmunofijación, las proteínas que se precipitan se tiñen con violeta ácido para permitir su visualización [1].

Espectro clínico de aplicación

La inmunofijación en suero está indicada en los pacientes que presentan un pico en las regiones beta o gamma de la electroforesis de proteínas en suero y que tienen sospecha de neoplasia de células plasmáticas, especialmente mieloma de células plasmáticas (también conocido como mieloma múltiple). De igual forma, si no se observa la banda en la electroforesis en suero, pero hay sospecha clínica de este tipo de neoplasia, está indicada la inmunofijación, ya que por su mayor sensibilidad y uso de anticuerpos específicos ayuda a identificar el componente monoclonal [2-4]. Hasta en el 93% de los pacientes con mieloma se detecta una proteína monoclonal en la inmunofijación en suero y la cifra aumenta a 97% si se complementa con inmunofijación en orina. Por ello, se recomienda que la búsqueda de proteína monoclonal se realice tanto en suero como en orina [5]. Aunque no cuantifica el componente monotípico, se emplea para el seguimiento y evaluación de respuesta al tratamiento de pacientes con estas neoplasias [2, 4].

Es importante aclarar que en los resultados de inmunofijación, citometría de flujo y otras pruebas en que se detecta la expresión de inmunoglobulinas, se usa el término “monotípico” para aquellos resultados que sugieren monoclonalidad, pues la clonalidad solo se puede determinar por técnicas moleculares; de forma similar, en caso que no haya componente monotípico y se observe un patrón policlonal, se emplea el término “polítípico” [6, 7].

Fundamento

La inmunofijación es una técnica que permite que una proteína quede anclada al sitio donde migró durante la electroforesis, lo cual se logra a partir de la formación de un complejo insoluble con anticuerpos. En términos generales, la inmunofijación consta de cuatro fases [1]:

- Separación de las proteínas mediante electroforesis en gel de agarosa.

- Fijación e inmunoprecipitación de las proteínas: se adicionan los antisueros respectivos y las soluciones fijadoras sobre la superficie del gel para identificar las proteínas específicas y precipitarlas.
- Remoción de proteínas solubles que no se precipitaron ni se unieron a los antisueros.
- Tinción de las proteínas precipitadas para permitir su visualización. Las bandas que se inmunoprecipitan se comparan con las bandas anormales observadas inicialmente en la electroforesis de proteínas y según la reacción con los antisueros se define su naturaleza y si corresponden o no a un componente monoclonal.

Teniendo en cuenta que se dispone de cinco antisueros (IgG, IgA, IgM, kappa y lambda), la muestra se aplica en cinco carriles diferentes para que se pueda apreciar la reacción de con cada antisuero; adicionalmente, hay un quinto carril en el que no se adiciona anticuerpo alguno y sirve como guía para mostrar el patrón electroforético del paciente [1].

Preparación del paciente

El paciente no requiere preparación especial. La muestra sérica se debe tomar de acuerdo con los procedimientos establecidos en cada laboratorio.

Tipo de muestra

Para el estudio se recomienda suero fresco. Se debe evitar usar plasma, ya que el fibrinógeno puede quedar en la zona gamma y confundirse con un componente monoclonal. De igual forma, se debe evitar el uso de muestras hemolizadas.

Manejo y conservación de las muestras

Las muestras, tan pronto como sea posible después de la separación del suero, se deben conservar en refrigeración (2°C a 8°C) y son estables hasta por una semana. Si se requiere almacenar por más tiempo, se deben congelar y son estables al menos un mes [1]. Antes de iniciar el procedimiento, la muestra se diluye de acuerdo con las indicaciones de los productores.

Casos especiales

- Si la concentración total de inmunoglobulinas es >2 g/dL, se recomienda diluir más las muestras, mientras que si la concentración es $<0,5$ g/dL, se deben diluir menos de lo normal [1].
- Si en todos los carriles se observa una fracción de apariencia monotípica, es probable que se trate de proteínas monoclonales, crioglobulina o IgM polimerizadas, en cuyo caso, se debe hacer un tratamiento previo del suero con beta-mercaptoetanol y soluciones diluidoras específicas de cada estuche para lograr la despolimerización [1].

Valores esperados

Se espera una tinción difusa y politípica de las inmunoglobulinas y de las cadenas livianas (ver figura 1-A).

Interpretación de los resultados

Presencia de un componente monotípico

- La presencia de una proteína monotípica por lo general se identifica por una banda muy definida y delimitada que reacciona con un anticuerpo contra cadena pesada y con uno contra cadenas livianas; ambas bandas migran en la misma distancia (ver figura 1-B).

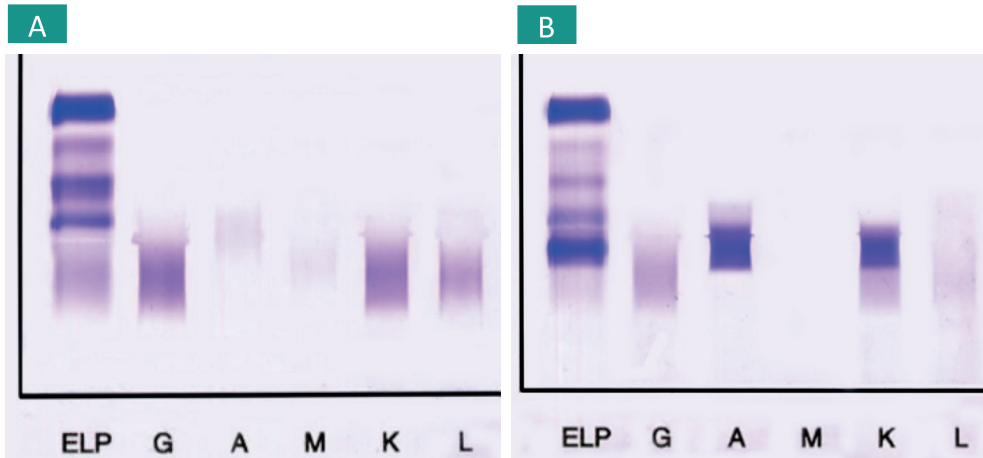


Figura 1. Inmunofijación en suero. A. Patrón normal; no se observa componente monotípico. B. Se observa componente monotípico IgA con restricción de cadenas kappa. Laboratorio Clínico Hematológico. Medellín, Colombia

- En ocasiones se puede observar una banda muy definida y delimitada solo con uno de los antisueros de cadenas livianas, mientras que las cadenas pesadas (IgA, IgG e IgM) resultan negativas. En estos casos, se puede deber a una neoplasia de células plasmáticas que secreta IgD o IgE, o bien, aunque menos común, corresponda a un mieloma de células plasmáticas secretor de cadenas livianas [8], pues este normalmente es nulo en la IF en suero, pero pvo en la IF en orina.
- Si solo se observa componente monotípico con un antisuero contra cadenas pesadas, pero no con cadenas livianas, se puede tratar de una gamapatía de cadenas pesadas.
- Si se observan dos bandas monotípicas de cadenas pesadas (que migran igual o en posición diferente) y dos de cadenas livianas (que migran igual o en posición diferente), se puede deber a una gamapatía biclonal.
- Si en la electroforesis de proteínas se observó un pico en la región gama pero en la inmunofijación no se detecta reacción alguna con antisueros contra cadenas pesadas ni livianas, es posible que el pico de la electroforesis correspondiese a fibrinógeno.

Ausencia de un componente monotípico

La ausencia de un componente monotípico es característica de pacientes sin neoplasias de células plasmáticas. En este caso, se puede observar un patrón politípico de inmunoglobulinas. De igual forma, es posible observar estados de hipergamaglobulinemia, los cuales se caracterizan por una tinción difusa e intensa de las inmunoglobulinas sin que se observe banda alguna que indique restricción.

En pacientes con mieloma de células plasmáticas no secretoras hay ausencia de componente monotípico y el diagnóstico se establece mediante el estudio de médula ósea y los criterios clínicos respectivos [3]. De igual forma, en el mieloma secretor de cadenas livianas es característico que la inmunofijación en suero no demuestre componente monotípico de cadenas libres y para el diagnóstico adecuado se requiere inmunofijación para proteínas Bence Jones en orina o prueba cuantitativa para medir cadenas livianas libres.

Limitaciones

Debido a su resolución y sensibilidad, es posible que en ocasiones no se detecte un componente monoclonal, como en casos de mieloma de células plasmáticas oligosecretor. Para ello, se debe tener en cuenta que el límite de detección es diferente para cada tipo de inmunoglobulina y de cadena libre. Los límites de detección, en g/L, para IgA, IgG, IgM, cadenas kappa y cadenas lambda son 0,25, 0,25, 0,12, 0,25 y 0,12, respectivamente. No obstante, cuando se emplea negro de amido para colorear las bandas, el límite de detección de IgG es de 0,5 g/L. En los demás casos, no varía el límite de detección [1, 9].

Adicionalmente, la inmunofijación en suero no es lo suficientemente sensible para detectar pequeñas cantidades de cadenas livianas libres en suero (como ocurre en el mieloma de células plasmáticas secretor de cadenas livianas) y el estudio se debe complementar con inmunofijación para Bence Jones en orina y si está disponible, con la cuantificación de cadenas livianas libres por nefelometría [8].

Observaciones adicionales de importancia

Los antisueros empleados para la identificación de cadenas livianas kappa y lambda no discriminan si éstas se encuentran libres en suero o si están unidas a cadenas pesadas. Por tal razón, si se desea la identificación y cuantificación de cadenas livianas libres, se recomienda el uso de métodos nefelométricos disponibles para tal fin [8]. Los resultados se deben correlacionar con los hallazgos clínicos, con la inmunofijación en orina específica para la detección de proteínas de Bence-Jones y otras pruebas de laboratorio [8].

Bibliografía

1. **Sebia**. HYDRAGEL IF K20. 2011/02.
2. **Bird JM, Owen RG, D'Sa S, Snowden JA, Pratt G, Ashcroft J, et al.** Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011. *Br J Haematol* 2011; 154: 32-75.
3. **Munshi NC.** Investigative tools for diagnosis and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008: 298-305.
4. **Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, Blade J, Barlogie B, Anderson K, et al.** International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006; 20: 1467-1473.
5. **Kyle RA, Rajkumar SV.** Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23: 3-9.
6. **Jaffe ES, Harris NL, Vardiman JW, Campo E, Arber DA.** *Hematopathology*. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.
7. **Feller AC, Diebold J.** *Histopathology of Nodal and Extranodal Non-Hodgkin's Lymphomas* (ed 3rd). Berlin: Springer-Verlag; 2004.
8. **Katzmann JA, Clark RJ, Abraham RS, Bryant S, Lymp JF, Bradwell AR, et al.** Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin Chem* 2002; 48: 1437-1444.
9. **Jaskowski TD, Litwin CM, Hill HR.** Detection of kappa and lambda light chain monoclonal proteins in human serum: automated immunoassay versus immunofixation electrophoresis. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 277-280.