

Instructions For Use

SAS-I Immunofix Cat. No. 200300

SAS-I Immunofix
Fiche technique
Réf. 200300

SAS-I Immunofixation
Anleitung
Kat. Nr. 200300

SAS-I Immunofissazione
Istruzioni per l'uso
Cod. 200300

SAS-I Inmunofijación
Instrucciones de uso
No de catálogo 200300

Contents

English	1
Français	9
Deutsch	17
Italiano	26
Español	35

INTENDED PURPOSE

The SAS-I IFE kit is intended for the separation and identification of monoclonal gammopathies by agarose gel electrophoresis.

Immunofixation electrophoresis (IFE) is a two stage procedure using high resolution agarose electrophoresis in the first stage, and immunoprecipitation in the second phase.

The greatest demand for IFE is in the clinical laboratory, where it is used primarily for the detection of monoclonal gammopathies. A monoclonal gammopathy is a primary disease state in which a single clone of plasma cells produce elevated levels of an immunoglobulin of a single class and type. Such immunoglobulins are referred to as monoclonal proteins, M-proteins or paraproteins. Their presence may be of a benign nature or of uncertain significance. In some cases, they are indicative of a malignancy, such as multiple myeloma or Waldenström's macroglobulinaemia. Differentiation must be made between polyclonal and monoclonal gammopathies, as polyclonal gammopathies are a secondary disease state due to clinical disorders such as chronic liver disease, collagen disorders, rheumatoid arthritis and chronic infection.

Urinary proteins are derived primarily from plasma proteins that filter through the kidney. The appearance of abnormal plasma proteins in the urine is of great value in evaluating renal function. The appropriate study of proteinuria should include quantitative and qualitative assessment of the type and amount of proteins excreted^{1,5}. The combination of electrophoretic separation of urine proteins, coupled to the identification of specific protein types by immunoprecipitation allows the differentiation of several types of proteinuria - Physiological, Glomerular (selective and non-selective), Tubular and proteinuria associated with Dysglobulinaemias^{1,5}.

Alfonso first described immunofixation in the literature in 1964⁶. Alper and Johnson published a more practical procedure in 1969, and published a number of studies utilising this technique⁷⁻⁹. Immunofixation has been used as a procedure for the investigation of immunoglobulins since 1976¹⁰⁻¹¹. The SAS-I IFE kit separates serum proteins according to charge in an agarose gel. The proteins are then incubated with monospecific antisera, washed and stained to allow visualization of the immunoprecipitate for qualitative interpretation.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

All reagents are for in-vitro diagnostic use only. Do not ingest or pipette by mouth any kit component. Wear gloves when handling all kit components. Refer to the product safety data sheet for risk and safety phrases and disposal information.

COMPOSITION

1. SAS-I IFE Gel

Contains agarose in a Tris / Barbitol buffer with thiomersal and sodium azide as preservative. The gel is ready for use as packaged.

2. Acid Violet Stain Concentrate

Contains concentrated Acid Violet stain. Dilute the contents of the bottle to 700ml with purified water. Stir overnight and filter before use. Store in a tightly stoppered bottle.

3. Destain Solution Concentrate

Dilute the contents of Destain A to 1 litre with purified water. Then add the contents of Destain B and add a further 1 litre of purified water, slowly.

4. Wash Solution

Contains 100ml of concentrated Wash Solution. Dilute 20ml to 1 litre with saline solution.

5. Sample Diluent

Contains Tris / Barbitol buffer with bromophenol blue and sodium azide as preservative. The diluent is ready for use as packaged.

6. SAS-I IFE Antisera Kit

Contains SP protein fixative (containing acetic acid and sulphosalicylic acid), and monospecific antisera to human immunoglobulins - IgG, IgA, IgM, Kappa Light Chain (free & bound) and Lambda Light Chain (free & bound). All antisera contain sodium azide as a preservative. The antisera are ready for use as packaged.

7. Other Kit Components

Each kit contains Instructions For Use and sufficient Blotters B, C, D, X and Blotter Combs to complete 10 gels.

STORAGE AND SHELF-LIFE

1. SAS-I IFE Gel

Gels should be stored at 15...30°C and are stable until the expiry date indicated on the package. DO NOT REFRIGERATE OR FREEZE. Deterioration of the gel may be indicated by 1) crystalline appearance indicating the gel has been frozen, 2) cracking and peeling indicating drying of the gel or 3) visible contamination of the agarose from bacterial or fungal sources.

2. Acid Violet Stain

The stain concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted stain solution is stable for 6 months at 15...30°C. It is recommended to discard used stain immediately to prevent depletion of staining capability. Poor staining performance may indicate deterioration.

3. Destain Solution

The destain concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted destain solution is stable for 6 months at 15...30°C.

4. Wash Solution

The Wash Solution concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted wash solution is stable for 6 months at 15...30°C. Cloudiness may indicate deterioration.

5. Sample Diluent

The Sample Diluent should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Cloudiness may indicate deterioration.

6. SAS-I IFE Antisera Kit

The antisera kit should be stored at 2...6°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Particulate contamination or cloudiness may indicate deterioration.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 210200 Sample Applicator Blades (1 x 10)

Cat. No. 210300 Sample Applicator Blades (5 x 10)

Cat. No. 210100 Disposable sample cups (100)

Cat. No. 5014 Development Weight (2.3kg)

Cat. No. 3100 REP Prep

Drying oven with forced air capable of 60...70°C.

Saline solution (0.85% NaCl)

The following items are not required for standard serum IFE but may be required for further investigation and Urine IFE investigation:

Cat. No. 220100 Antiserum to Human Urine Total Protein (2ml)

Cat. No. 220200 Antiserum to Human Urine Micro Proteins (2ml)

Cat. No. 220300 Antiserum to Human Urine Macro Proteins (2ml)

Cat. No. 220400 Antiserum to Human GAM Proteins (2ml)

Cat. No. 220700 Antiserum to Human Free & Bound Kappa Light Chain (2ml)

Cat. No. 220800 Antiserum to Human Free & Bound Lambda Light Chain (2ml)

Cat. No. 220500 Antiserum to Human Free Kappa Light Chain (2ml)

Cat. No. 220600 Antiserum to Human Free Lambda Light Chain (2ml)

Cat. No. 220900 Antiserum to Human Urine Pentavalent/Albumin (2ml)

Cat. No. 221000 Antiserum to Human Urine Pentavalent (2ml)

Cat. No. 9249 Antiserum to Human IgD

Cat. No. 9250 Antiserum to Human IgE

Cat. No. 9400 IFE Control Kit

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Freshly collected serum is the specimen of choice. Samples can be stored at 15...30°C for up to 4 days, 2...6°C for up to 2 weeks or 6 months at -20°C⁵.

Urine samples should be applied neat. Serum samples should be diluted according to the following table using Sample Diluent:

Monoclonal Concentration	SP Lane	G, A, M, K, λ
<3g/L	1+2	Neat
3-10g/L	1+2	1+4
10-25g/L	1+2	1+9
25-50g/L	1+2	1+19

STEP BY STEP PROCEDURE

- Pipette 35µl of the sample into the appropriate well of the SAS-I sample tray or disposable sample cups.
 - SAS-I & SAS-I Plus users:** Carefully place the sample tray onto the applicator drawer. Ensure that the tray is pushed firmly down into position.
 - SAS-3 users:** Carefully locate the sample tray using the sample base locating pins. Ensure that the tray is positioned securely.
- Remove the gel from the packaging and:
 - SAS-I users:** place the gel in the SAS-I, agarose side up, aligning the positive and negative sides with the corresponding electrode posts.

- ii) **SAS-1 Plus users:** dispense 400 μ L of REP Prep onto the heat sink. Place the gel onto the heat sink, agarose side up, aligning the positive and negative sides with the corresponding electrode posts, taking care to avoid air bubbles under the gel.
- iii) **SAS-3 users:** place the alignment guide onto the pins and dispense 400 μ L of REP Prep onto the centre of the chamber. Place the gel into the chamber agarose side up, using the guide, align the positive and negative sides with the corresponding electrode posts, taking care to avoid air bubbles under the gel.
3. Blot the surface of the gel with a blotter C, discard the blotter.
4. i) **SAS-1 users:** attach the electrodes onto the top side of the electrode posts so that they are in contact with the gel blocks.
 ii) **SAS-1 Plus users:** (as above). Place the cover over the gel and electrodes and press firmly for 5 seconds to ensure contact.
 iii) **SAS-3 users:** attach the electrodes onto the the electrode posts so that they are in contact with the gel blocks.
5. Place 2 applicator blade assemblies in position on the instrument, (**SAS-3 users: slot A and 10**).
6. Perform the Immunofix electrophoresis:
 - i) **SAS-1 users:** 80 volts, 20 mins
 - ii) **SAS-1 Plus users:** Electrophoresis: 100 volts, 18 mins, 20°C
 Incubation Step 1: 8 mins, 37°C (incubate)
 Incubation Step 2: 8 mins, 40°C (D blot)
 - iii) **SAS-3 users:**

Step	Time (mm:ss)	Temperature (°C)	Voltage	Other
Load Sample	00:30	21		Speed 1
Apply Sample	00:30	21		Speed 1*
Electrophoresis	17:00	21	100	
Apply antisera	10:00	21		
Insert Combs	02:00	21		
Blotter D	05:00	40		
Dry	08:00	54		

* Use Location 2

NOTE 1: For Serum immunofixation, 1 sample application is required. For Urine immunofixation, 10 sample applications are required. Remove the gel blocks prior to drying.

NOTE 2: Urine and serum samples can be run simultaneously on one gel. However, each individual row must contain one type of sample only (eg. top row = urine, bottom row = serum). If a combination of serum and urine are to be used on the same gel, place both blades onto the SAS-1plus, and remove the 'serum' blade after the first load/application. Leave the 'urine' blade to complete the other 9 load/applications.

7. Following electrophoresis, (**SAS-1 Plus users:** remove the cover), remove the electrodes from the surface of the gel. (**SAS-3 users:** remove the alignment guide). Position the antiserum application template onto the gel surface. **NOTE:** The milled antisera channels should be aligned centrally over the printed box on the gel in which the samples are applied.
8. Apply 2 drops (or 50 μ L) of Protein Fixative (serum) or Total Antiserum (urine) into the hole of the SP lane and 2 drops (or 50 μ L) of the appropriate antiserum into the hole of the immunoglobulin lanes. Ensure that the fixative and antisera have completely filled the channels.
9. Incubate the gel. (**SAS-1 users:** incubate at 15...30°C).

10. Following incubation, place a blotter comb into the holes of the antiserum template. Allow 2 minutes for the excess antisera to be absorbed, then remove the blotter combs and the template from the gel surface.
11. **i) SAS-I users:** Remove the gel blocks using the Gel Block Remover and wash the gel in wash solution for 5 minutes.
ii) SAS-I Plus and SAS-3 users: Place a blotter D (smooth side down) onto the surface of the gel, leave for 10 seconds and remove.
12. **i) SAS-I users:** Place the gel on a blotter D agarose side up and place a blotter B (wetted in wash solution) onto the surface of the gel followed by two blotter X's. Press the gel using the Development Weight for 10 minutes.
ii) SAS-I Plus and SAS-3 users: Place a blotter D (smooth side down) onto the surface of the gel and replace the antiserum template to hold the blotter flat. Blot the gel.
13. **i) SAS-I users:** Remove the blotters and place the gel in wash solution for 4 minutes with gentle agitation.
ii) SAS-I Plus and SAS-3 users: Remove the blotter D.
14. **i) SAS-I users:** Remove the gel from the wash solution and place on a blotter D agarose side up. Place a blotter B (wetted in wash solution) onto the surface of the gel followed by a blotter D. Press the gel for 3 minutes.
ii) SAS-I Plus and SAS-3 users: Remove the gel blocks using the Gel Block Remover. Go to Step 16.
15. **i) SAS-I users:** Remove the blotters.
NOTE: Immediately after use, clean the antisera template with a mild, biocidal detergent. If possible, scrub the bottom of the template with a toothbrush or small test tube brush. Do not let the antisera dry on the template. Build up of antisera on the surface of the template will result in the formation of bubbles during the antisera application step. Dry the antisera template thoroughly. Water left in the holes will hinder the application of antisera for the next use. Store the template upside down to increase the air circulation and thus the drying potential of the applicator.
16. Attach the gel to the staining chamber holder.
17. Select the IFE test program on the staining unit and, following the prompts, Wash, Stain, Destain and Dry the gel.

a) SAS-2 (Auto-Stainer)

Step	Solution	Time (mm:ss)	Port	Temp (°C)
Dry	—	10:00		55
Wash	Wash solution	07:00	4	
Stain	Acid Violet Stain	03:00	5	
Destain	Destain solution	02:00	2	
Dry	—	05:00		65
Wash	Wash solution	03:00	4	
Wash	Wash solution	03:00	4	
Dry	—	05:00		65

b) SAS-4 (Auto-Stainer)

Step	Time (mm:ss)	Temp (°C)	Other
Wash	00:03		Recirculate ON
Wash	10:00		Recirculate ON

Stain	04:00	Recirculate ON
Destain	02:00	Recirculate ON
Destain	02:00	Recirculate ON
Dry	12:00	

63

c) **Manual**

Follow the sequence listed for the SAS-2 staining unit, using a staining bath for the Stain, Destain and Wash steps, and a Drying Oven with forced air at 60...70°C for the Dry steps.

- At the end of the staining cycle, remove the gel from the staining chamber. The gel is now ready for examination.

INTERPRETATION OF RESULTS

The majority of monoclonal proteins migrate in the cathodic, gamma region of the protein pattern, but due to their abnormal nature, they may migrate anywhere within the globulin region on protein electrophoresis. The monoclonal protein band on the immunofixation pattern will occupy the same position and shape as the abnormal band on the serum protein pattern. The abnormal protein is identified by the antiserum type it reacts with.

When low concentrations of abnormal protein are present, the abnormal band may appear as a band within the normal polyclonal immunoglobulin. A band can also be seen within a polyclonal background when there is a large polyclonal immunoglobulin presence also.

The publication 'Immunofixation for the Identification of Monoclonal Gammopathies' is available from Helena BioSciences on request.

Urine Immunofixation:

Type of Proteinuria

Normal urine
Glomerular

Bands Observed On Gel

Small albumin band
Albumin, alpha-1,
beta, gamma

Proteins Present

albumin
albumin, alpha-1
antitrypsin, transferrin,
gamma globulins
Retinol Binding Protein,
beta2-microglobulin,
alpha-2 microglobulin.
immunoglobulins,
free light chains

Tubular

alpha-1, alpha-2, beta

Overflow

gamma or variable

LIMITATIONS

1. Antigen Excess

Antigen excess will occur if there is not a slight antibody excess or antigen / antibody equivalence at the site of precipitation. Antigen excess in IFE is usually due to an excess of the immunoglobulin in the patient sample. Antigen excess is characterised by prozoning (unstained areas in the centre of the immunofixed protein band, with staining around the edges). A higher dilution of the sample should be used in this event to optimise the immunoglobulin concentration.

2. Non-Specific Precipitation in All Immunoglobulin Lanes

Occasionally a completed IFE plate exhibits a precipitate band in the same position in every pattern across the plate. This may result from:

- IgM monoclonal immunoglobulins.**

IgM monoclonal proteins can adhere to the gel matrix. A band will appear in all 5 antiserum lanes of the gel. However, where the band reacts with a specific antiserum for the heavy chain and light chain, there will be an increase in size and staining intensity of the band, allowing the immunoglobulin type to be identified. Additional dilution of the sample will improve the discrimination between the IgM-antibody reaction and the non-specific staining of precipitated IgM protein in other lanes, simplifying the diagnosis.

b) High Titres of RF or Immune Complexes.

Samples with high titres of Rheumatoid Factor or other immune complexes may show a preprecipitate band at the sample application point. Reducing the sample with DTT or β -2-mercaptoethanol can eliminate this non-specific reaction (Mix 190 μ L of diluted serum to 10 μ L of 1% (w/v) DTT in 0.85% saline solution or mix 100 μ L of serum with 10 μ L of a 1:10 dilution of β -2-mercaptoethanol in water. Perform the IFE as usual. Note: Always work in a fume hood when using β -2-mercaptoethanol).

c) Fibrinogen.

Fibrinogen, if present in the sample, will show as a discrete band in all lanes of the immunofixation pattern. Fibrinogen is present in plasma, and sometimes in the serum of patients on anticoagulant therapy.

3. Reaction With Kappa or Lambda Light Chain Antisera but No Reaction with IgG, IgA or IgM Heavy Chain Antisera.

Samples showing this pattern may either have a free light chain monoclonal gammopathy or they may have an IgD or IgE monoclonal protein. In this situation, the IFE should be repeated, substituting IgD and IgE antisera for two of the other heavy chain antisera. Failure to obtain a reaction with IgD or IgE antisera would be indicative of free light chain disease.

4. Band In Gamma Region Showing No Reactivity With IFE Antisera.

C Reactive Protein (CRP) may be detected in patients with acute inflammatory response¹²⁻¹³. CRP appears as a narrow band at the cathodic end of the serum protein pattern. Elevated Alpha1-Antitrypsin and Haptoglobin are supportive evidence for CRP. Patients with a CRP band will probably have an elevated level when assayed for CRP. A narrow band on the point of sample application can sometimes be seen which can be caused by chylomicrons in the serum or precipitated protein in samples which have been stored frozen.

5. Non-Reactivity With Kappa and Lambda Antisera

Occasionally a sample will have a reaction with a heavy chain antiserum but no light chain reaction is obvious. In this situation, the following need to be ruled out - a) Heavy chain disease, b) Very high concentrations of light chains, leading to antigen excess, c) Low concentrations of light chains, d) Atypical light chain molecule that does not react with the antiserum, e) Light Chains with 'hidden' light chain determinants (as sometimes seen with IgA and IgD). To obtain definitive results, testing may include a) A higher or lower dilution of the sample to optimise the antibody / antigen equivalence, b) Antisera from more than one manufacturer to aid in the identification of atypical immunoglobulins, and c) Treat the sample with β -2-mercaptoethanol to 'reveal' the light chains.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A series of samples were tested and compared to another commercially available test kit - both kits showed equivalent results.

QUALITY CONTROL

Helena Biosciences IFE Control Kit (Cat. No. 9400) can be used to confirm the presence of monoclonal banding in all antisera lanes.

Helena Biosciences Kemtrol Abnormal Serum Control (Cat. No. 7025) can be diluted 1 in 100 and used as a positive control for Urine IFE.

BIBLIOGRAPHY

1. Fauchier, P. and Catalan, F. 'Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis' Alfred Fournier Institute, Paris, France, 1988.
2. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. and Tyllia, M.M. 'Finding Clues to Disease in Urine' Diagnostic Medicine, 1980 ; May/June : 69-75.
3. Umbreit, A. and Wiedemann, G. 'Determination of Urinary Protein Fractions. A Comparison With Different Electrophoretic Methods and Quantitatively Determined Protein Concentrations' Clin. Chim. Acta., 2000; 297 : 163-172.
4. Wiedemann, G. and Umbreit, A. 'Determination of Urinary Protein Fractions by Different Electrophoretic Methods', Clin. Lab.; 1999, 45 : 257-262.
5. Wong, W.K., Wieringa, G.E., Stec, Z., Russell, J., Cooke, S., Keevil, B.G. and Lockhart, S. 'A Comparison of Three Procedures for the Detection of Bence-Jones Proteinuria' Ann. Clin. Biochem., 1997, 34 : 371-374.
6. Afonso, E., 'Quantitation Immunoelectrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
7. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox. Sang., 1969; 17 : 445-452.
8. Alper, C.A., 'Genetic Polymorphism of Complement Components as a Probe of Structure and Function', Progress in Immunology. First International Congress of Immunology. 1971 : 609-624, Academic Press, New York.
9. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of Alpha(1)-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of Pi M.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
10. Cawley, L.P., Minard, B.J, Tourtellotte, W.W., Ma, B.I. and Chelle, C., 'Immunofixation Electrophoretic Technique Applied to Identification of Proteins in Serum and Cerebrospinal Fluid', Clin. Chem., 1976; 22 : 1262-1268.
11. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976; 22 : 1982-1985.
12. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B. and Franzen, B., 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25 (4) : 629-638.
13. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. and Tyllia, M.M., 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

UTILISATION

Le kit SAS-I IFE est utilisé pour la séparation et l'identification des gammopathies monoclonales par électrophorèse en gel d'agarose.

L'immunofixation (IFE) est une procédure en deux étapes utilisant l'électrophorèse haute résolution en gel d'agarose dans en premier temps puis l'immunoprécipitation dans un deuxième temps.

C'est en biologie médicale que l'on utilise le plus fréquemment l'IFE pour la détection des gammopathies monoclonales. Une gammopathie monoclonale est un état primaire de maladie dans laquelle un seul clone de cellule plasmatisque produit en quantité élevée une immunoglobuline d'une seule classe et d'un seul type. Ces immunoglobulines sont appelées protéines monoclonales, protéines-M ou paraprotéines. Leur présence peut être de nature bénigne ou de signification incertaine. Dans certains cas, elles révèlent une malignité comme les myélomes multiples ou Waldenström. Une différence doit être faite entre gammopathie polyclonale ou monoclonale, la gammopathie polyclonale étant le stade secondaire de maladie due à un désordre clinique comme l'affection chronique hépatique, les désordres du collagène, les rhumatismes articulaires et les infections chroniques.

Les protéines urinaires sont principalement dérivées de la filtration des protéines plasmatiques par le rein. L'apparition de protéines plasmatiques anormales dans les urines est d'une grande valeur dans l'évaluation de la fonction rénale. L'étude de la protéinurie doit inclure l'évaluation qualitative et quantitative du type et de la quantité des protéines excrétées^{1,5}. La combinaison de l'électrophorèse urinaire, couplée à l'identification spécifique du type des protéines par immunoprécipitation, permet la différenciation de plusieurs types de protéinurie - Physiologique, Glomérulaire (sélective et non-sélective), Tubulaire et protéinurie associée à une Dysglobulinémie^{1,5}.

Alfonso fut le premier à décrire l'immunofixation dans la littérature en 1964⁶. Alper et Johnson publièrent ensuite une procédure plus simple en 1969, puis de nombreuses études utilisant cette technique^{7,9}. L'immunofixation est utilisée comme procédure d'investigation des immunoglobulines depuis 1976^{10,11}. Le kit SAS-I IFE sépare les protéines sériques selon leur charge en gel d'agarose. Les protéines sont ensuite mises en contact avec un antisérum monospécifique, lavées et colorées pour permettre la visualisation de l'immunoprécipité en vue d'une interprétation qualitative.

PRECAUTIONS

Tous les réactifs sont à usage diagnostique in-vitro uniquement. Ne pas ingérer ou pipeter à la bouche aucun composant. Porter des gants pour la manipulation de tous les composants. Se reporter aux fiches de sécurité des composants du kit pour la manipulation et l'élimination.

COMPOSITION

1. **Plaque SAS-I IFE**

Contient de l'agarose dans un tampon Tris / barbital additionné de thimérosol et d'azide de sodium comme conservateur. Le gel est prêt à l'emploi.

2. **Colorant Acide Violet**

Contient du colorant acide violet concentré. Dissoudre le contenu du bouteille dans 700ml d'eau distillée, laisser sous agitation toute une nuit. Filtrer avant utilisation. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

3. Solution décolorante

Diluer le contenu de décolorant A avec 1 litre d'eau distillée. Ajouter ensuite le contenu de décolorant B puis, lentement, 1 autres litre d'eau distillée.

4. Solution de lavage

Contient 100ml de solution de lavage concentrée. Diluer 20ml dans 1 litres de solution saline.

5. Solution diluant échantillon

Contient de tampon Tris / Babital additionné de bleu de bromophénol et d'azide de sodium comme conservateur. Le diluant est prêt à l'emploi.

6. SAS-I IFE Antiséra kit

Contient un bouteille de solution fixative SP contenant de l'acide acétique et de l'acide sulfosalicylique, et des antiséra monospécifiques dirigés contre les immunoglobulines humaines - IgG, IgA, IgM, Chaîne légère Kappa (Libre et liée), Chaîne légère Lambda (Libre et liée). Tous les antiséra contiennent d'azide de sodium comme conservateur. Les antiséra sont prêt à l'emploi.

7. Autres composants du kit

Chaque kit contient également 1 fiche technique, des buvards B, C, D, X et peignes pour 10 gels.

STOCKAGE ET CONSERVATION

1. Plaque SAS-I IFE

Les gels doivent être conservés entre 15...30°C, ils sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. NE PAS REFRIGERER OU CONGELER. Les conditions suivantes indiquent une détérioration du gel: 1) cristaux visibles indiquant que le gel a été congelé, 2) de craquelures témoins d'une déshydratation du gel, 3) une contamination visible bactérienne ou fongique.

2. Colorant Acide Violet

Le colorant concentré doit être conservé entre 15...30°C, il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le colorant reconstitué est stable 6 mois entre 15...30°C. Il est recommandé de rejeter le colorant utilisé afin de prévenir une diminution de la capacité de coloration. Une performance de coloration diminuée, indique une détérioration.

3. Décolorant

Le décolorant concentré doit être conservé entre 15...30°C, il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le décolorant dilué est stable 6 mois entre 15...30°C.

4. Solution de lavage

Le solution de lavage doit être conservé entre 15...30°C, elle est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le solution de lavage dilué est stable 6 mois entre 15...30°C. Un aspect floconneux indique une détérioration.

5. Solution diluant échantillon

Le diluant échantillon doit être conservé entre 15...30°C, il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Un aspect floconneux indique une détérioration.

6. SAS-I IFE Antiséra kit

Les antiséra doivent être conservés entre 2...6°C et sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Une contamination ou une aspect floconneux indique une détérioration.

MATERIELS NECESSAIRES NON FOURNIS

- Réf. 210200 Applicateurs échantillons 1 x 10
 Réf. 210300 Applicateurs échantillons 5 x 10
 Réf. 210100 Cupules échantillons jetables 100
 Réf. 5014 Poids à développement (2.3kg)
 Réf. 3100 REP Prep
 Etuve ventilée jusqu'à 70°C
 Solution saline (0.85% NaCl)

Les réactifs suivants ne sont pas nécessaires pour la réalisation d'une IFE sérum standard mais peuvent être utilisés pour une investigation plus poussée et pour l'IFE Urinaire:

- Réf. 220100 Antisérums Total Protéine Urinaire humaine (2ml)
 Réf. 220200 Antisérums Micro Protéine Urinaire humaine (2ml)
 Réf. 220300 Antisérums Macro Protéine Urinaire humaine (2ml)
 Réf. 220400 Antisérums GAM humaine (2ml)
 Réf. 220700 Antisérums Chaîne légère libre et lié Kappa (2ml)
 Réf. 220800 Antisérums Chaîne légère libre et lié Lambda (2ml)
 Réf. 220500 Antisérums Chaîne légère libre Kappa (2ml)
 Réf. 220600 Antisérums Chaîne légère libre Lambda (2ml)
 Réf. 220900 Antisérums Urinaire Pentavalent/Albumine humain (2ml)
 Réf. 221000 Antisérums Urinaire Pentavalent humain (2ml)
 Réf. 9249 Antisérums IgD humaine
 Réf. 9250 Antisérums IgE humaine
 Réf. 9400 IFE controle Kit

PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS

L'utilisation de sérums fraîchement prélevés est fortement recommandée. Les échantillons peuvent être conservés 4 jours à 15...30°C, 2 semaines à 2...6°C ou 6 mois à -20°C.

Les échantillons urinaires doivent être déposés purs. Les échantillons sériques doivent être dilués à l'aide du diluant selon la table ci-dessous:

Concentration monoclonal	Case SP	G, A, M, κ, λ
<3 g/L	I+2	Pur
3-10 g/L	I+2	I+4
10-25 g/L	I+2	I+9
25-50 g/L	I+2	I+19

METHODOLOGIE

- Déposer 35µL de sérum dans les puits échantillon du SAS-I portoir échantillon ou dans les puits à usage unique.
- Pour les utilisateurs SAS-I et SAS-I Plus:** Délicatement, placer le portoir échantillon sur le chariot applicateur. S'assurer que le portoir est fermement positionner dans son emplacement.
 - Pour les utilisateurs SAS-3:** Mettre en place le porte-échantillon avec précaution à l'aide des ergots de guidage de l'embase. S'assurer qu'il est solidement mis en place.
- Sortir le gel de son emballage protecteur et:
 - Pour les utilisateurs SAS-I:** Placer le gel dans le SAS-I, agarose vers le haut, en respectant les polarités. L'électrode positive est positionné sur l'avant du chariot.

- ii) **Pour les utilisateurs SAS-1 Plus:** Déposer 400µl de REP-prep dans le dissipateur thermique. Placer le gel sur le dissipateur thermique, agarose vers le haut, en respectant les polarités. L'électrode positive est positionné sur l'avant du chariot en n veillant à ce qu'il n'y ait pas de bulles d'air sous le gel.
- iii) **Pour les utilisateurs SAS-3:** Placer le guide d'alignement sur les picots et déposer 400µl de REP-prep au centre de la chambre. Placer le gel dans la chambre, agarose vers le haut, en respectant les polarités. L'électrode positive est positionné sur l'avant du chariot en n veillant à ce qu'il n'y ait pas de bulles d'air sous le gel.
3. Sécher la surface entière du gel à l'aide d'un buvard C, jeter le buvard.
4. **i) Pour les utilisateurs SAS-1:** Mettre en contact les électrodes avec les plot de fixation. S'assurer que les électrodes soient positionnées sur les ponts d'agarose.
- ii) Pour les utilisateurs SAS-1 Plus:** (même chose que ci-dessus). Mettre le couvercle sur le gel et les électrodes et faire pression 5 secondes pour assurer un bon contact.
- iii) Pour les utilisateurs SAS-3:** Mettre en contact les électrodes avec les plot de fixation (à l'intérieur). S'assurer que les électrodes soient positionnées sur les ponts d'agarose.
5. Placer deux applicateurs en position sur le instrument. (**Pour les utilisateurs SAS-3:** encoches A et 10).
6. Lancer l'électrophorèse des Immunofix:
- i) **Pour les utilisateurs SAS-1:** 80 Volts, 20 minutes
- ii) **Pour les utilisateurs SAS-1 Plus:** L'électrophorèse: 100 Volts, 18 minutes, 22°C
Incubation l'étape 1: 8 minutes, 37°C (Incubation)
Incubation l'étape 2: 8 minutes, 40°C (D sécher)

iii) **Pour les utilisateurs SAS-3:**

Etape	Temps (mm:ss)	Temp (°C)	Voltage	Autre
Chargement échant.	00:30	21		Vitesse 1
Application échant.	00:30	21		Vitesse 1*
Electrophorèse	17:00	21	100	
Incubation Antiséra	10:00	21		
Buvards Peigne	02:00	21		
Buvard D	05:00	40		
Séchage	08:00	54		

* Utiliser la position N°2.

NOTE: Pour l'immunofixation sérique, 1 seule application est nécessaire. Pour l'immunofixation urinaire, 10 applications sont nécessaires. Enlever les ponts d'agarose avant de procéder au séchage.

7. A la fin de l'électrophorèse (**Pour les utilisateurs SAS-1 Plus:** Enlever le couvercle), retirer les électrodes de la surface du gel. (**Pour les utilisateurs SAS-3:** Enlever le guide d'alignement). Placer le masque applicateur antisérum sur le gel. **NOTE:** les cases antisérum doivent être alignées sur les cases imprimées du gel en correspondance avec les échantillons déposés.
8. Déposer 2 gouttes (ou 50µL) de solution fixative (sérum) ou d'antisérum Total (urine) dans le trou de la case SP et 2 gouttes (ou 50µL) de l'antisérum approprié dans le trou de chaque case immunoglobuline. S'assurer que la solution fixative et les antiséra remplissent complètement les cases.
9. Incuber le gel. (**Pour les utilisateurs SAS-1:** Incuber à 15...30°C).

10. A la fin du temps d'incubation, déposer 1 buvard peigne dans les trous du masque antisérum. Laisser 2 minutes afin que l'excès d'antisérum soit absorbé, ensuite retirer le peigne ainsi que le masque antisérum de la surface du gel.
11. **Pour les utilisateurs SAS-I:** Retirer les ponts de tampon de la surface du gel en utilisant la raclette et placer le gel dans un bain de solution de lavage sous agitation douce pendant 5 minutes.
Pour les utilisateurs SAS-I Plus et SAS-3: Déposer un buvard D (face lisse vers le bas) sur le gel, partez pendant 10 secondes et enlevez.
12. **Pour les utilisateurs SAS-I:** Placer le gel, agarose vers le haut, sur un buvard D. Déposer un buvard B (imbibé de solution de lavage) sur le gel puis par dessus deux buvards X. Presser à l'aide des poids à développement pendant 10 minutes.
Pour les utilisateurs SAS-I Plus et SAS-3: Déposer un buvard D (face lisse vers le bas) sur le gel et repositionner le masque applicateur par dessus afin de permettre au buvard de rester parfaitement plat. Laisser le Buvard.
13. **Pour les utilisateurs SAS-I:** Retirer les buvards et placer le gel dans un bain de solution de lavage sous agitation douce pendant 4 minutes.
Pour les utilisateurs SAS-I Plus et SAS-3: Retirer le buvard.
14. **Pour les utilisateurs SAS-I:** Sortir le gel de la solution de lavage et le placer sur un buvard D, agarose vers le haut. Déposer un buvard B (imbibé de solution saline) sur le gel puis par dessus un buvard D. Presser pendant 3 minutes.
Pour les utilisateurs SAS-I Plus et SAS-3: Retirer les ponts de tampon de la surface du gel en utilisant la raclette. Passez à l'étape 16.
15. **Pour les utilisateurs SAS-I:** Retirer les buvards.
NOTE: Immédiatement après utilisation, laver le masque antisérum avec un léger détergent. Si possible, frotter l'arrière du masque avec un brosse à dents. Ne pas laisser les antiséras séchés sur le masque. Une accumulation d'antisérum dans la masque, entraînera la formation de bulles durant l'étape d'application des antiséras. Sécher le masque vigoureusement. La présence d'eau dans la lumière des cases et des trous d'injection peut empêcher l'application de l'antisérum lors de l'utilisation suivante. Conserver le masque applicateur à l'envers afin de permettre une parfaite circulation d'air.
16. Fixer le gel sur le portoir de coloration.
17. Sélectionner le programme IFE sur le module de coloration et suivre les étapes, lavage, coloration, décoloration et séchage.

a) SAS-2 (module de coloration)

Etape	Solution	Temps (mm:ss)	Port	Temp (°C)
Dry	—	10:00		55
Wash	Solution de lavage	07:00	4	
Stain	Colorant Acide Violet	03:00	5	
Destain	Solution décolorante	02:00	2	
Dry	—	05:00		65
Wash	Solution de lavage	03:00	4	
Wash	Solution de lavage	03:00	4	
Dry	—	05:00		65

b) SAS-4 (module de coloration)

Étape	Temps (mm:ss)	Temp (°C)	Autre
Lavage 1	00:03		Recirculation Oui
Lavage 2	10:00		Recirculation Oui
Colorant	04:00		Recirculation Oui
Décolorant	02:00		Recirculation Oui
Décolorant	02:00		Recirculation Oui
Séchage	12:00	63	

c) Manuellement

Suivre la séquence le module de coloration, en utilisant des bains de solution fixative, colorante, décolorant et d'eau. Sécher dans une étuve ventilée entre 60...70°C.

18. A la fin du cycle de coloration, sortir le gel de la chambre de coloration. Le gel est prêt pour l'interprétation.

INTERPRETATION DES RESULTATS

La majorité des protéines monoclonales migrent du côté cathodique, dans la région des gamma du protidogramme, mais du fait de leur nature anormale, elles peuvent migrer dans la zone des globulines. La protéine monoclonale doit occuper la même position et avoir la même forme que la bande anormale du protéinogramme. La protéine anormale est identifiée par les antiséras avec lesquelles elle a réagi.

Dans le cas de faible concentration d'une protéine anormale, celle-ci peut apparaître comme une bande dans un environnement d'immunoglobuline polyclonale normal. Une bande peut aussi être détectée dans un bruit de fond polyclonal lorsqu'il y a également augmentation polyclonale des immunoglobulines.

La publication "Immunofixation for the identification of Monoclonal Gammopathies" est disponible auprès d'Helena BioSciences sur demande.

Immunofixation urinaire	Bandes observées sur le gel	Protéines présentes
Urine Normale	Fine bande d'albumine	Albumine
Atteinte Glomérulaire	Albumine, Alpha 1, Béta, Gamma	Albumine, Alpha 1 Antitrypsine, Transferrine Gammaglobulines
Atteinte Tubulaire	Alpha 1, Alpha 2, Béta	Rétinol Binding Protein, Béta 2 microglobuline
Surchage	Gammaglobulines ou autres	Alpha 2 microglobuline Immunoglobulines, Chaîne légère libre

LIMITES**1. Excès d'antigène.**

L'excès d'antigène se produit lorsqu'il n'y a ni un manque d'excès d'anticorps ou une faible équivalence antigène / anticorps au niveau du site de précipitation. L'excès d'antigène en IFE est essentiellement dû à un excès d'immunoglobuline dans le sérum du patient. Cet excès se caractérise par un "effet de zone" (apparition d'une zone incolore cernée de colorant). Une dilution supérieure de l'échantillon est nécessaire pour optimiser la concentration d'immunoglobuline.

2. Précipitation non spécifique dans toutes les cases.

Occasionnellement, une IFE montre une bande précipitant au même niveau dans toutes les cases. Cela peut provenir de:

a) Immunoglobuline monoclonale de type IgM.

Les protéines monoclonales de type IgM ont tendance à adhérer sur la trame du gel. Une bande apparaît donc dans les 5 cases. Toutefois, la chaîne lourde et ses chaînes légères correspondantes apparaissent nettement plus colorées et mieux définies, ce qui permet l'identification de la protéine anormale. Une dilution plus importante de l'échantillon permet d'améliorer la différenciation entre la réaction avec l'anticorps-IgM et la coloration non spécifique du précipité d'IgM, simplifiant ainsi le diagnostic.

b) Taux élevé de Facteur Rhumatoïde ou d'immun-complexe.

Des échantillons présentant un taux élevé de Facteur Rhumatoïde ou d'immun-complexe peuvent former un précipité au point de dépôt. Une réduction de l'échantillon grâce au DTT ou β -2-mercaptoéthanol peut éliminer cette réaction non spécifique (Mélanger 190 μ L de dilution d'échantillon avec 10 μ L de 1% DTT en solution saline ou mélanger 100 μ L de sérum pur avec 10 μ L de solution au 1/10 de β -2-mercaptoéthanol en solution. Réaliser l'IFE normalement.

NOTE: Toujours travailler sous hotte avec le β -2-mercaptoéthanol).

c) Fibrinogène.

Si le fibrinogène est présent dans l'échantillon, il peut apparaître sous forme d'une très fine bande dans toutes les cases de l'IFE. Le fibrinogène est présent dans le plasma, mais également se retrouver dans le sérum de patient sous anticoagulant.

3. Une réaction avec les chaînes Kappa ou Lambda sans correspondance avec les chaînes lourdes IgG, IgA ou IgM.

Les échantillons présentant cette réaction peuvent avoir une chaîne libre monoclonale ou une IgD ou IgE monoclonale. Dans cette situation, il est nécessaire de recommencer l'IFE en substituant les antiséras IgD et IgE à deux autres chaînes lourdes. Un défaut de réaction avec les antiséras IgD et IgE indiquera la présence d'une chaîne légère libre.

4. Une bande dans la région des gamma sans réaction avec les antiséras.

La protéine C réactive (CRP) peut être détectée chez les patients avec une réponse inflammatoire aiguë^{12,13}. La CRP apparaît comme une bande étroite en position cathodique du protéinogramme du patient. Une élévation de l'Alpha I-Antitrypsine et de l'Haptoglobine corrobore la présence de CRP. Les patients avec une bande CRP présente généralement un dosage élevé de CRP. Une bande étroite au niveau du point d'application peut parfois être due à la présence de chylomicrons dans le sérum ou à une précipitation des protéines due à la congélation.

5. Pas de réaction avec les chaînes légères Kappa ou Lambda.

Occasionnellement un échantillon peut présenter une absence de réponse en chaîne légère malgré la réponse en chaîne lourde. Dans ce cas, il convient d'éliminer a) Maladie des chaînes lourdes, b) Très forte concentration de chaînes légères, induisant un excès d'antigène, c) faible concentration de chaînes légères, d) chaînes légères atypiques ne réagissant pas avec les antiséras courants, e) chaînes légères avec des déterminants antigéniques "cachés" (souvent rencontré avec les IgA ou IgD). Pour obtenir un résultat définitif, il faut tester, a) des dilutions plus fortes ou plus faibles afin d'optimiser l'équivalence antigène/anticorps, b) des antiséras de plusieurs fabricants pour aider à l'identification de l'immunoglobuline atypique, et c) traiter le sérum au β -2-mercaptoéthanol afin de révéler les chaînes légères.

PERFORMANCES

Différents échantillons ont été réalisés et comparés avec un autre kit du commerce. Les résultats obtenus sur ces deux kits, montrent des résultats équivalents. Le contrôle Kemtrol sérum anormal Helena Biosciences (réf. 7025) peut être dilué au 1/100 et utilisé comme contrôle positif pour les IFE d'urine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fauchier, P. and Catalan, F. 'Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis' Alfred Fournier Institute, Paris, France, 1988.
2. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. and Tyllia, M.M. 'Finding Clues to Disease in Urine' Diagnostic Medicine, 1980 ; May/June : 69-75.
3. Umbreit, A. and Wiedemann, G. 'Determination of Urinary Protein Fractions. A Comparison With Different Electrophoretic Methods and Quantitatively Determined Protein Concentrations' Clin. Chim. Acta., 2000; 297 : 163-172.
4. Wiedemann, G. and Umbreit, A. 'Determination of Urinary Protein Fractions by Different Electrophoretic Methods', Clin. Lab.; 1999, 45 : 257-262.
5. Wong, W.K., Wieringa, G.E., Stec, Z., Russell, J., Cooke, S., Keevil, B.G. and Lockhart, S. 'A Comparison of Three Procedures for the Detection of Bence-Jones Proteinuria' Ann. Clin. Biochem., 1997, 34 : 371-374.
6. Afonso, E., 'Quantitation Immunoelectrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
7. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox. Sang., 1969; 17 : 445-452.
8. Alper, C.A., 'Genetic Polymorphism of Complement Components as a Probe of Structure and Function', Progress in Immunology. First International Congress of Immunology. 1971 : 609-624, Academic Press, New York.
9. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of Alpha(1)-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of Pi M.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
10. Cawley, L.P., Minard, B.J, Tourtellotte, W.W., Ma, B.I. and Chelle, C., 'Immunofixation Electrophoretic Technique Applied to Identification of Proteins in Serum and Cerebrospinal Fluid', Clin. Chem., 1976; 22 : 1262-1268.
11. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976; 22 : 1982-1985.
12. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B. and Franzen, B., 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25 (4) : 629-638.
13. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. and Tyllia, M.M., 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

ANWENDUNGSBEREICH

Der SAS-I IFE Kit dient zur Auftrennung und Identifizierung von monoklonalen Gammopathien durch Agarosegel- Elektrophorese.

Immunfixationselektrophorese (IFE) läuft in zwei Phasen ab. Die erste Phase verwendet Agarose-Elektrophorese in hoher Auflösung, gefolgt von Immunpräzipitation in der zweiten Phase.

Der größte Anwendungsbedarf für IFE liegt im klinischen Laborbereich, hier vor allem in der Diagnose von monoklonalen Gammopathien. Bei einer monoklonalen Gammopathie handelt es sich um eine Primärerkrankung, in der ein einzelner Klon von Plasmazellen vermehrt erhöhte Mengen von Immunglobulin einer einzelnen Klasse und eines einzelnen Types produziert. Solche Immunglobuline werden als monoklonale Proteine, M-Proteine oder Paraproteine bezeichnet. Ihre Anwesenheit kann von harmloser Natur oder unspezifischer Bedeutung sein. In manchen Fällen ist ihr Nachweis ein Hinweis auf das Vorliegen einer malignen Erkrankung, wie dem multiplen Myelom oder Morbus Waldenström. Man muss zwischen polyklonalen und monoklonalen Gammopathien unterscheiden. Polyklonale Gammopathien sind sekundäre Erkrankungszustände, die durch chronische Lebererkrankungen, Kollagenosen, rheumatoide Arthritis und chronische Infektionen hervorgerufen werden.

Urin-Proteine stammen in der Hauptsache von Plasmaproteinen, die durch die Niere filtern. Das Vorkommen von anormalen Plasmaproteinen im Urin ist bei der Beurteilung der Nierenfunktion von großer Bedeutung. Studien der Proteinurie sollten quantitative und qualitative Untersuchungen von Typ und Menge der ausgeschiedenen Proteine umfassen¹⁻⁵. Die Kombination der elektrophoretischen Auftrennung von Urin-Proteinen mit der Immunpräzipitation erlaubt die Unterteilung mehrerer Proteinurieformen: physiologische, glomeruläre (selektiv und nicht-selektiv), tubuläre Proteinurie sowie Proteinurie, die mit Dysglobulinämien in Verbindung steht¹⁻⁵.

Die Immunfixation wurde erstmals von Alfonso in der Literatur im Jahre 1964⁶ beschrieben. Im Jahre 1969 veröffentlichten Alper und Johnson ein praktischeres Verfahren. Sie veröffentlichten eine Reihe von Studien, in denen dieses Vorgehen Anwendung fand^{7,9}. Immunfixation ist seit 1976 als Verfahren zur Untersuchung von Immunglobulinen im Einsatz^{10,11}.

Mit dem SAS-I IFE Kit werden Serumproteine entsprechend ihrer Ladung im Agarosegel aufgetrennt. Die Proteine werden dann mit monospezifischen Antisera inkubiert, gewaschen und gefärbt, um die Immunausfällung zur qualitativen Beurteilung sichtbar zu machen.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien sind nur zur In-Vitro-Diagnostik bestimmt. Nicht einnehmen oder mit dem Mund pipettieren. Das Tragen von Handschuhen beim Umgang mit den Kit-Komponenten ist erforderlich. Bitte lesen Sie das Sicherheitsdatenblatt mit den Gefahrenhinweisen und Sicherheitsvorschlägen zu den Komponenten, sowie die Informationen zur Entsorgung.

INHALT

1. SAS-I IFE-Gel

Enthält Agarose in einem Tris / Barbitalpuffer mit Thiomersal und Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.

2. Säures-Violett-Farbstoff

Enthält eine konzentrierte Säures-Violett-Farbstoff-Lösung. Den Inhalt der Flasche mit 700ml dest. Wasser verdünnen. über Nacht rühren und vor dem Gebrauch filtern. Lagerung des Farbstoffs in einer fest verschlossenen Flasche.

3. Entfärbelösung

Den Inhalt Entfärbelösung A mit 1 Liter destilliertem Wasser verdünnen. Danach den Inhalt Entfärbelösung B und weitere 1 Liter destilliertes Wasser langsam hinzufügen.

4. Waschflüssigkeit

Enthält 100ml konzentrierte Waschflüssigkeit. Verdünnen 20ml in 1 litre Kochsalzlösung.

5. Verdünnungsmittel

Enthält Tris / Barbitol-Puffer mit Bromphenolblau und Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Verdünnungsmittel ist gebrauchsfertig verpackt.

6. SAS-I IFE Antiseren Kit

Enthält SP-Fixierlösung aus Essig- und Sulphosalicylsäure sowie monospezifische Antiseren gegen menschliche Immunglobuline, IgG, IgA, IgM sowie freie und gebundene Kappa- und Lambda-Leichtketten. Alle Antiseren enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Die Antiseren sind gebrauchsfertig verpackt.

7. Weitere Kit-Komponenten

Jeder Kit enthält eine Methodenbeschreibung sowie ausreichend Blotter C, D und Kämmen für 10 Gele.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. SAS-I IFE-Gel

Gele sollten bei 15...30°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. NICHT IM KÜHLSCHRANK ODER TIEFKÜHLSCHRANK AUFBEWAHREN! Der Verfall des Gels zeigt sich durch 1) Kristallisation, die auf ein Einfrieren des Gels hindeutet, 2) Brüchigkeit und Abblättern, die auf ein Austrocknen des Gels hindeuten, bzw. 3) sichtbare Kontamination der Agarose durch Bakterien oder Pilze.

2. Säures-Violett-Farbstoff

Das Farbstoff-Konzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Farbstofflösung ist für 6 Monate stabil bei einer Temperatur zwischen 15...30°C. Es wird empfohlen, den benutzten Farbstoff unverzüglich zu entsorgen, um den Verlust der Färbungsfähigkeit zu verhindern. Eine schlechte Färbung weist auf den Verfall der Farbstofflösung hin.

3. Entfärbelösung

Das Entfärbekonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte ist für 6 Monate stabil bei einer Temperatur zwischen 15...30°C.

4. Waschflüssigkeit

Die Waschflüssigkeit sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Waschflüssigkeit ist für 6 Monate stabil bei einer Temperatur zwischen 15...30°C. Trübung kann auf den Verfall der Waschflüssigkeit hinweisen.

5. Verdünnungsmittel

Das Verdünnungsmittel sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Trübung kann auf den Verfall der Entfärbelösung hinweisen.

6. SAS-I IFE Antiseren Kit

Der Antiseren Kit sollte bei 2...6°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Verunreinigung mit kleinen Teilchen oder Eintrübung kann auf eine Produktverschlechterung hindeuten.

NICHT MITGELIEFERTES ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 210200 Probenapplikatormembranen (1 x 10)

Kat. Nr. 210300 Probenapplikatormembranen (5 x 10)

Kat. Nr. 210100 Einweg-Probenbecher (100)

Kat. Nr. 5014 Entwicklungsgewicht (2.3kg)

Kat. Nr. 3100 REP Prep

Ofen mit Umluft und einer Temperaturleistung von 70°C.

Kochsalzlösung (0,85% NaCl)

Obgleich die folgenden Antiseren für Standardserum-IFE nicht benötigt werden, könnten sie für weitere Untersuchungen und Urin IFE Untersuchungen erforderlich sein:

Kat. Nr. 220100 Antiserum gegen humanes Urin-Gesamtprotein (2ml)

Kat. Nr. 220200 Antiserum gegen humane Urin-Mikroproteine (2ml)

Kat. Nr. 220300 Antiserum gegen humane Urin-Makroproteine (2ml)

Kat. Nr. 220400 Antiserum gegen humane GAM-Proteine (2ml)

Kat. Nr. 220700 Antiserum gegen humane freie und gebundene Kappa-Leichtketten (2ml)

Kat. Nr. 220800 Antiserum gegen humane freie und gebundene Lambda-Leichtketten (2ml)

Kat. Nr. 220500 Antiserum gegen humane freie Kappa-Leichtketten (2ml)

Kat. Nr. 220600 Antiserum gegen humane freie Lambda-Leichtketten (2ml)

Kat. Nr. 220900 Antiserum gegen humanes Urin-Pentavalent / Albumin (2ml)

Kat. Nr. 221000 Antiserum gegen humanes Urin-Pentavalent (2ml)

Kat. Nr. 9249 Antiserum gegen humanes IgD

Kat. Nr. 9250 Antiserum gegen humanes IgE

Kat. Nr. 9400 IFE Kontroll-Kit

PROBENAHEME UND VORBEREITUNG

Frisches Serum ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Die Proben können bis zu 4 Tage bei 15...30°C, bis zu 2 Wochen bei 2...6°C und bis zu 6 Monate bei -20°C aufbewahrt werden.

Urinproben sollten unverdünnt aufgetragen werden. Serumproben sollten den Angaben in der folgenden Tabelle entsprechend mit Proben-Verdünnungsmittel verdünnt werden:

Monoklonale Konzentration	SP-Spur	G, A, M, κ, λ
>3 g/L	1+2	unverdünnt
3-10 g/L	1+2	1+4
10-25 g/L	1+2	1+9
25-50 g/L	1+2	1+19

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

- Pipettieren Sie 35µl der Probe in die geeignete Vertiefung der Probenschale SAS-I oder der Einweg- Probenbecher.
 - Nur für SAS-I und SAS-I Plus:** Stellen Sie die Probenschale vorsichtig auf den Applikatoreinschub. Achten Sie darauf, dass die Schale fest in Position ist.
 - Nur für SAS-3:** Mit den Haltestiften der Probenbasis die Probenplatte vorsichtig einrichten. Sicherstellen, dass die Platte richtig eingesetzt ist.
- Nehmen Sie das Gel aus der Verpackung und:
 - Nur für SAS-I:** Legen Sie das Gel es in das SAS-I (Agarose nach oben). Die positiven und negativen Seiten sind auf die entsprechenden Elektrodenhalter auszurichten.
 - Nur für SAS-I Plus:** 400µL REP-Prep-Lösung auf die Kühlplatte verteilen. Das Gel mit der Agaroseseite nach oben auf die Kühlplatte legen (Agarose nach oben). Die positiven und negativen Seiten sind auf die entsprechenden Elektrodenhalter auszurichten. Darauf achten, dass unter dem Gel keine Luftblasen sind.
 - Nur für SAS-3:** Die Führungsschiene auf die Stifte setzen und 400µl REP-Prep auf die Kammermitte verteilen. Das Gel mit der Agaroseseite nach oben in die Kammer legen und mit Hilfe der Schiene die positive und negative Seite an dem passenden Elektrodenhalter ausrichten. Darauf achten, dass unter dem Gel keine Luftblasen sind.
- Blotten Sie die Geloberfläche mit einem Blotter C und werfen Sie den Blotter anschließend.
- Nur für SAS-I:** Befestigen Sie die Elektroden oben auf den Elektrodenhaltern, damit sie mit den Pufferblöcken in Kontakt sind.
 - Nur für SAS-I Plus:** (wie oben). Die Abdeckung über Gel und Elektroden geben und für einen guten Kontakt 5 Sekunden lang fest aufdrücken.
 - Nur für SAS-3:** Befestigen Sie die Elektroden nach innen auf den Elektrodenhaltern, damit sie mit den Pufferblöcken in Kontakt sind.
- Bringen Sie die beiden Applikatormembran-Einheiten auf dem Instrument in Position. (**Nur für SAS-3:** Schlitz A und I0).
- Führen Sie die Elektrophorese des Immunofixation:
 - Nur für SAS-I:** 80 Volt, 20 Minuten.
 - Nur für SAS-I Plus:** Elektrophorese: 100 Volt, 18 Minuten, 20°C
Inkubieren Schritt 1: 8 Minuten, 37°C (Inkubieren)
Inkubieren Schritt 2: 8 Minuten, 40°C (D Blotten)
- Nur für SAS-3:**

Schritt	Dauer(mm:zz)	Temp. (°C)	Spannung	Sonstiges
Probe laden	00:30	21		Geschwind. I
Probe auftragen	00:30	21		Geschwind. I*
Elektrophorese	17:00	21	100	
Antiseren auftragen	10:00	21		
Kämme eingeben	02:00	21		
Blotter D	05:00	40		
Trocknen	08:00	54		

* Standort 2

BITTE BEACHTEN: Für die Serum-Immunfixation ist 1 Probenapplikation erforderlich. Für die Urin-Fixation sind 10 Probenapplikationen von Dauer erforderlich. Gel-Blöcke vor dem Trocknen entfernen.

7. Am Ende der Elektrophorese (**Nur für SAS-I Plus:** Abdeckung entfernen), entfernen Sie die Elektroden von der Geloberfläche. (**Nur für SAS-3:** Führungsschiene entfernen). Legen Sie die Antiserumschablone auf die Geloberfläche. **BITTE BEACHTEN:** Die Antiseren-Hohlräume müssen mittig über dem aufgedruckten Rechteck auf dem Gel, in dem die Proben appliziert worden sind, liegen.
8. Pipettieren Sie 2 Tropfen (oder 50 μ L) der Protein-Fixierlösung (Serum) oder des Gesamt-Antiserums (Urin) in das Loch der SP-Spur und 2 Tropfen (oder 50 μ L) des entsprechenden Antiserums in das Loch der Immunglobulin-Spuren. Fixierlösungen und Antiseren müssen die Kanäle vollständig gefüllt haben.
9. Inkubieren Sie das Gel (**Nur für SAS-I:** Inkubieren bei 15...30°C).
10. Am Ende der Inkubationsphase platzieren Sie 1 Blotterkamm in die Löcher der Antiserumschablone. 2 Minuten die überschüssigen Antiseren absorbieren lassen. Anschließend entfernen Sie die Blotterkämme und die Schablone vom Gel.
11. **Nur für SAS-I:** Entfernen Sie die Pufferblöcke von der Geloberfläche mit dem speziellen Gelblock-Entferner. Waschen Sie das Gel vorsichtig 5 Minuten lang in einer Waschflüssigkeit.
Nur für SAS-I Plus und SAS-3: Legen Sie einen Blotter D (glatte Seite nach unten) auf das Gel, verlassen Sie für 10 Sekunden und entfernen Sie.
12. **Nur für SAS-I:** Legen Sie das Gel auf einen Blotter D (Agarose nach oben!). Auf das Gel legen Sie einen mit Waschflüssigkeit befeuchteten Blotter B, sowie anschließend zwei Blotter X. Pressen Sie das Gel für 10 Minuten ein Entwicklungsgewicht benutzen.
Nur für SAS-I Plus und SAS-3: Legen Sie einen Blotter D (glatte Seite nach unten) auf das Gel und bringen Sie die Antiserumschablone wieder an, damit der Blotter flach aufliegt. Blottern Sie das Gel.
13. **Nur für SAS-I:** Entfernen Sie die Blotter und waschen Sie das Gel vorsichtig 4 Minuten lang in einer Waschflüssigkeit.
Nur für SAS-I Plus und SAS-3: Entfernen Sie den Blotter D.
14. **Nur für SAS-I:** Entnehmen Sie das Gel der Waschflüssigkeit und legen Sie es mit der Agaroseseite nach oben auf einen Blotter D. Auf das Gel legen Sie einen mit Waschflüssigkeit befeuchteten Blotter B, sowie anschließend einen Blotter D. Pressen Sie das Gel für 3 Minuten in ein Entwicklungsgewicht).
Nur für SAS-I Plus und SAS-3: Entfernen Sie die Pufferblöcke von der Geloberfläche mit dem speziellen Gelblock-Entferner. Gehen Sie zu Schritt 16.
15. **Nur für SAS-I:** Entfernen Sie die Blotter
BITTE BEACHTEN: Unmittelbar nach Gebrauch reinigen Sie die Antiserenschablone mit einem milden Biozid. Falls möglich scheuern Sie den Unterteil der Schablone mit einer Zahnbürste oder einer kleinen Reagenzglasbürste. Lassen Sie die Antiseren nicht auf der Schablone trocknen. Eine Anhäufung von Antiseren auf der Schablone führt bei der Antiserenapplikation zur Bildung von Luftblasen. Trocknen Sie die Antiserenschablone gründlich. Wenn Wasser in den Löchern verbleibt, wird die Applikation von Antiseren bei der nächsten Verwendung beeinträchtigt. Drehen Sie zur Erhöhung des Luftdurchflusses die Schablone bei der Lagerung um. Somit trocknet der Applikator schneller.
16. Befestigen das Gel Sie es am Färbekammerhalter.

17. Wählen Sie das IFE-Testprogramm auf der Färbereinheit an. Folgen Sie den Anweisungen und waschen, färben und trocknen Sie das Gel.

a) **SAS-2 (Färbekammer)**

Schritt	Lösung	Dauer (mm:zz)	Öffnung	Temp (°C)
Trocknen	—	10:00		55
Waschen	Wäschelösung	07:00	4	
Färben	Saures-Violett-Farbstoff	03:00	5	
Entfärben	Entfärbelösung	02:00	2	
Trocknen	—	05:00		65
Waschen	Wäschelösung	03:00	4	
Waschen	Wäschelösung	03:00	4	
Trocknen	—	05:00		65

b) **SAS-4 (Färbekammer)**

Schritt	Dauer(mm:zz)	Temp. (°C)	Sonstiges
Waschvorgang	00:03		Umlauf EIN
Waschvorgang	10:00		Umlauf EIN
Färben	04:00		Umlauf EIN
Entfärben	02:00		Umlauf EIN
Entfärben	02:00		Umlauf EIN
Trocknen	12:00	63	

b) **Manuell**

Folgen Sie der für den Färbekammerhalter angegebenen Reihenfolge. Verwenden Sie ein Färbekammer für das Fixieren, Färben, Entfärben und Waschen und einen Trockner mit Gebläseluft bei 60...70°C für das Trocknen.

18. Am Ende des Färbeprozesses nehmen Sie das Gel aus der Färbekammer heraus. Das Gel ist jetzt prüfbar.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die meisten monoklonalen Proteine wandern zur Kathode oder in den Gammabereich des Eiweißmusters. Sie können allerdings aufgrund ihrer pathologischen Eigenschaften während der Elektrophorese in jeden Bereich der Globulinregion wandern. Die monoklonale Eiweißbande auf dem Immundefixierungsmuster nimmt die gleiche Position und Gestalt an wie die pathologische Bande auf dem Serumweißmuster. Das pathologische Protein wird durch den Antiserumtyp, mit dem es reagiert, erkannt.

Geringe Konzentration an pathologischem Eiweiß kann dazu führen, daß die Bande nur sehr zart als Bestandteil des normalen polyklonalen Hintergrundes wahrgenommen werden kann. Bei starker polyklonaler Immunglobulinkonzentrationen können einzelne pathologische Banden überlagert werden. Im Zweifelsfall ist die Probe in höherer Verdünnung erneut zu analysieren.

Die Veröffentlichung 'Immunofixation for the Identification of Monoclonal Gammopathies' ist auf Anfrage bei Helena BioSciences erhältlich.

Urin-Immundefixation:**Typ der Proteinurie**

Normales Urin

Glomerulär

Tubulär

überfluss

Auf dem Gel beobachtete Banden

Kleine Albuminbande

Albumin, Alpha-1,
Beta, Gamma

Alpha-1, Alpha-2, Beta

Gamma oder variabel

Vorhandene Proteine

Albumin

Albumin, Alpha-1
Antitrypsin,

Transferrin,

Gammaglobuline

Retinol bindendes

Protein,

Beta-2 Mikroglobulin,

Alpha-2

Mikroglobulin

Immunglobuline,

freie Leichtketten

EINSCHRÄNKUNGEN**1. Antigenüberschuss**

Wenn es an der Ausfällungsstelle nicht zu einem leichten Antikörperüberschuss oder einem Antigen - Antikörperausgleich kommt, wird ein Antigenüberschuss auftreten. In der Regel ist ein Antigenüberschuss in IFE auf einen Überschuss von Immunglobulin in der Patientenprobe zurückzuführen. Antigenüberschuss ist durch das Prozonephänomen charakterisiert. Dabei kommt es zur Bildung von ungefärbten Arealen in der Mitte und gefärbten an den Rändern der immunfixierten Eiweißbande. Wenn dieses Phänomen auftritt, sollte eine stärker verdünnte Probe verwendet werden, damit die Immunglobulinkonzentration optimiert wird.

2. Unspezifische Ausfällung in allen Immunglobulinreihen

Gelegentlich zeigt eine fertige IFE-Platte eine Ausfällungsbande an der gleichen Stelle in jedem Muster über die Platte verteilt. Die Ursache dafür ist:

a) IgM monoklonale Immunglobuline.

IgM monoklonale Proteine können sich an die Gel-Matrix anheften. Als Folge davon erscheint eine Bande in fünf Antiserumreihen des Gels. Wo die Bande allerdings mit einem spezifischen Antiserum für schwere und leichte Ketten reagiert, vergrößert sich die Bande und ihre Färbungsintensität, wodurch der Immunglobulintyp erkennbar wird. Die Diagnose wird weiterhin vereinfacht, indem die Probe weiter verdünnt wird, wodurch die Unterscheidung zwischen der IgM Antikörper Reaktion und der unspezifischen Färbung des ausgefallenen IgM Proteins in den anderen Reihen verbessert wird.

b) Hohe Rheumafaktoren-Titer oder Immunkomplexe.

Proben mit hohen Rheumafaktoren-Titern oder anderen Immunkomplexen können am Probenauftragungsort eine Ausfällungsbande anzeigen. Reduktion der Probe mit DTT oder β -2-Mercaptoethanol kann diese unspezifische Reaktion verhindern. (Vermischen Sie $190\mu\text{L}$ Serum mit $10\mu\text{L}$ DTT 1% in einer 0,85% Kochsalzlösung, oder mischen Sie $100\mu\text{L}$ Serum mit $10\mu\text{L}$ einer 1:10 verdünnter Lösung β -2-Mercaptoethanol in Wasser). Führen Sie die IFE wie gewohnt durch. **BITTE BEACHTEN:** Beim Umgang mit β -2-Mercaptoethanol immer unter der Abzugshaube arbeiten.

c) Fibrinogen.

Wenn sich Fibrinogen in der Probe befindet, zeigt sich das als schwache Bande in allen Reihen des Immunglobulinmusters. Fibrinogen befindet sich im Plasma und manchmal im Serum von Patienten unter Anticoaganztherapie.

3. Reaktion mit Kappa- oder Lambda-Leichtketten-Antiseren, aber keine Reaktion mit IgG, IgA oder IgM Schwereketten-Antiseren.

Proben, die dieses Verhalten zeigen, haben entweder eine freie Leichtketten (monoklonale) Gammopathie oder eventuell ein IgD oder IgE monoklonales Protein. Unter diesen Umständen sollte die IFE unter Einsatz von IgD- und IgE-Antiseren oder Verwendung von Antiseren gegen freie Kappa und Lambda Leichtketten wiederholt werden. Falls es nicht zur Reaktion mit IgD- oder IgE-Antiseren kommt, kann dies ein Hinweis für eine Leichtkettengammopathie sein.

4. Die Bande in der Gamma-Region zeigt keine Reaktion mit den IFE-Antiseren.

C reaktives Protein (CRP) kann bei Patienten mit akuten Entzündungsprozessen gefunden werden¹²⁻¹³. Das C reaktive Protein erscheint am Kathodenende des Serumproteinmusters als schmales Band. Erhöhte Alpha-1-Antitrypsin- und Haptoglobinwerte weisen ebenfalls auf die Anwesenheit von CRP hin. Patienten, die eine CRP-Bande aufweisen, haben in der Regel ein erhöhtes CRP. Manchmal sieht man eine schmale Bande am Punkt der Probenauftragung. Diese kann durch Chylomikronen im Serum oder aber durch ausgefallenes Eiweiß in Proben, die gefroren gelagert wurden, verursacht sein.

5. Keine Reaktion mit Kappa- und Lambda-Antiseren.

Gelegentlich reagiert eine Probe mit dem Antiserum einer schweren Kette, wenn keine Reaktion mit einer leichten Kette erkennbar ist. In dieser Situation muss folgendes ausgeschlossen werden: a) Schwerekettenkrankheit, b) sehr hohe Leichtkettenkonzentrationen, die zu einem Antigenüberschuss führen, c) eine niedrige Konzentration der leichten Ketten, d) ein atypisches Leichtkettenmolekül, das nicht mit dem Antiserum reagiert, e) leichte Ketten mit 'versteckten' Leichtkettendeterminanten (manchmal bei IgA und IgD zu finden). Um definitive Resultate zu erzielen, sollten die Tests folgendes einschließen: a) eine stärkere oder schwächere Verdünnung der Probe, um das Antikörper-Antigen-Gleichgewicht zu optimieren, b) Verwendung von Antiseren verschiedener Hersteller, um die Erkennung von atypischen Antikörpern zu gewährleisten, c) Behandeln Sie die Probe mit β -2-Mercaptoethanol, um die leichten Ketten 'aufzudecken'.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Eine Anzahl Proben wurden mit dieser Methode und einem anderen kommerziell erhältlichen Testkit analysiert und die erhaltenen Meßwerte verglichen. Beide Methoden liefern übereinstimmende Resultate.

Die abnormale Serumkontrolle von Helena Biosciences Kemtrol (Kat. Nr. 7025) kann 1 + 100 verdünnt und für IFE im Urin als Positivkontrolle verwendet werden.

LITERATUR

1. Fauchier, P. and Catalan, F. 'Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis' Alfred Fournier Institute, Paris, France, 1988.
2. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. and Tyllia, M.M. 'Finding Clues to Disease in Urine' Diagnostic Medicine, 1980 ; May/June : 69-75.
3. Umbreit, A. and Wiedemann, G. 'Determination of Urinary Protein Fractions. A Comparison With Different Electrophoretic Methods and Quantitatively Determined Protein Concentrations' Clin. Chim. Acta., 2000; 297 : 163-172.
4. Wiedemann, G. and Umbreit, A. 'Determination of Urinary Protein Fractions by Different Electrophoretic Methods', Clin. Lab.; 1999, 45 : 257-262.
5. Wong, W.K., Wieringa, G.E., Stec, Z., Russell, J., Cooke, S., Keevil, B.G. and Lockhart, S. 'A Comparison of Three Procedures for the Detection of Bence-Jones Proteinuria' Ann. Clin. Biochem., 1997, 34 : 371-374.
6. Afonso, E., 'Quantitation Immunoelectrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
7. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox. Sang., 1969; 17 : 445-452.
8. Alper, C.A., 'Genetic Polymorphism of Complement Components as a Probe of Structure and Function', Progress in Immunology. First International Congress of Immunology. 1971 : 609-624, Academic Press, New York.
9. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of Alpha(1)-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of Pi M.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
10. Cawley, L.P., Minard, B.J, Tourtellotte, W.W., Ma, B.I. and Chelle, C., 'Immunofixation Electrophoretic Technique Applied to Identification of Proteins in Serum and Cerebrospinal Fluid', Clin. Chem., 1976; 22 : 1262-1268.
11. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976; 22 : 1982-1985.
12. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B. and Franzen, B., 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25 (4) : 629-638.
13. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. and Tyllia, M.M., 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

PRINCIPIO

Il kit SAS-I Immunofix è stato formulato per la separazione ed identificazione delle gammopatie monoclonali mediante elettroforesi proteica su gel di agarosio.

L'immunofissazione (IFE) è una procedura che avviene in 2 passaggi: inizialmente viene eseguita un elettroforesi ad alta risoluzione, successivamente avviene l'immunoprecipitazione.

La maggior parte delle richieste di IFE è nei laboratori clinici, dove viene impiegata essenzialmente per la determinazione delle gammopatie monoclonali. La gammopatia monoclonale è una malattia in cui un singolo clone di cellule plasmatiche produce elevati livelli di immunoglobuline di una singola classe e tipo. Tali immunoglobuline sono identificate come proteine monoclonali o paraproteine. La loro presenza può essere di natura benigna oppure di incerto significato. In alcuni casi sono indicativi di tumori maligni come mielomi multipli o la macroglobulinemia di Waldenström's. Bisogna differenziare le gammopatie policlonali da quelle monoclonali.

Le gammopatie policlonali sono il secondo stato di malattie dovute a disordini clinici come l'epatopatia cronica, disordini del collagene, reumatismi, artriti e infezioni croniche. Le proteine presenti nell'urina derivano principalmente dalle proteine plasmatiche filtrate dal rene. La presenza di proteine plasmatiche anomale nell'urina assume una grande importanza nella valutazione delle funzioni renali, pertanto un'analisi adeguata della proteinuria dovrebbe comprendere la verifica quantitativa e qualitativa del tipo e della quantità di proteine escrete^{1,5}. La combinazione fra separazione elettroforetica delle proteine urinarie, abbinata all'identificazione di tipi specifici di proteine attraverso immunoprecipitazione, permette la differenziazione di diversi tipi di proteinuria-fisiologica, glomerulare (selettiva e non selettiva), tubulare e proteinuria associata a disglobulinemie^{1,5}.

Alfonso è stato il primo a descrivere l'immunofissazione in letteratura nel 1964⁶.

Alper e Johnson pubblicarono molte procedure nel 1969 e pubblicarono i loro studi utilizzando questa tecnica dal 1972 al 1974^{7,9}. L'immunofissazione è stata impiegata come procedura di investigazione di immunoglobulinemie nel 1976^{10,11}. Il kit SAS-I IFE separa le sieroproteine in base alla loro carica elettrica in gel di agarosio. Le proteine vengono quindi incubate con l'antisiero monospecifico, lavate e colorate. Al termine si visualizza l'immunoprecipitato.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutti i reagenti sono solo per uso diagnostico in vitro. Non ingerire o pipettare con la bocca alcun componente del kit. Indossare i guanti quando si maneggiano tutti i componenti del kit. Fare riferimento alle schede dati di sicurezza del prodotto per conoscere i rischi dei componenti, la sicurezza nell'utilizzarli ed ulteriori informazioni.

COMPOSIZIONE

1. Piastre SAS-I IFE

Contengono agarosio in tampone tris / barbital con thimerosal e sodio azide come conservanti. Il gel è pronto per l'uso.

2. Colorante Acido Viola concentrato

Contiene colorante acido viola concentrato. Diluire l'intero contenuto della bottiglia con 700ml di acqua distillata. Agitare "overnight" e filtrare prima dell'uso. Conservare in bottiglia chiusi.

3. Soluzione decolorante concentrata

Diluire il contenuto di decolorante A con 1 litri di acqua distillata. Poi aggiungere lentamente il contenuto di decolorante B e altri 1 litri di acqua distillata.

4. Soluzione di lavaggio

Contiene 100ml di soluzione di lavaggio concentrata. Diluire 20ml in 1 litri di soluzione fisiologica.

5. Soluzione diluente campione

Contiene di tampone Tris / Barbitol con l'aggiunta di blu di bromofenolo e sodio azide come conservante. Il diluente è pronto per l'uso.

6. Set antisieri SAS-I IFE**Contenente:**

- un fissante proteico, costituito da una soluzione di acido solfosalicilico e acido acetico.
- antisieri monospesifici contro le immunoglobuline umane IgG, A, M.
- catene leggere umane kappa e lambda (libere e legate).

Tutti gli antisieri contengono sodio azide come conservante. Gli antisieri sono pronti all'uso.

7. Altri componenti del Kit

Ogni kit contiene la metodica originale, blotter C, D ed pettini ed cuvette in quantità sufficiente per 10 gel.

CONSERVAZIONE E STABILITA'**1. Piastre SAS-I Sieroproteine**

I gels devono essere conservati a 15...30°C, e sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. **NON REFRIGERARE O CONGELARE.**

Il deterioramento del gel può essere indicato da:

- 1) presenza di cristalli sulla superficie, dovuta al congelamento.
- 2) rottura o assottigliamento, dovuti all'asciugatura.
- 3) visibile contaminazione dell'agarosio da parte di batteri o funghi sporigeni.

2. Colorante Acido Blu

Il colorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C, ed è stabile fino alla data riportata sull'etichetta. Il colorante ricostituito è stabile per 6 mesi, se conservato a 15...30°C. Scartare immediatamente il colorante utilizzato. La scarsa colorazione può indicare un deterioramento.

3. Soluzione decolorante

Il decolorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Il decolorante ricostituito è stabile per 6 mesi, se conservato a 15...30°C.

4. Soluzione di lavaggio

Il soluzione di lavaggio deve essere conservato a 15...30°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. La soluzione di lavaggio ricostituita è stabile per 6 mesi, se conservata 15...30°C. La presenza di torbidità indica il deterioramento.

5. Soluzione diluente campione

La soluzione diluente campione deve essere conservata a 15...30°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. La presenza di torbidità indica il deterioramento.

6. Set Antisieri SAS-I IFE

Il Kit degli antisieri deve essere conservato a 2...6°C, sono stabili fino a data di scadenza riportata sull'etichetta di ogni flaconcino. Particelle in sospensione o torbidità indicano il loro deterioramento.

MATERIALE RICHIESTO MA NON FORNITO

- Cod. 210200 Applicatori 1 x 10
- Cod. 210300 Applicatori 5 x 10
- Cod. 210100 Cuvetter portacampioni, monouso 100
- Cod. 5014 peso di suiloppo (2.3kg)
- Cod. 3100 REP Prep

Forno ad aria forzata con temperature fino a 70°C.

Soluzione fisiologica (0.85% NaCl)

I seguenti articoli non sono necessari per una IFE SIERO standard, ma possono essere richiesti per ulteriori indagini e per le IFE URINE.

- Cod. 220100 Antisiero Proteine Urinarie Totali (2ml)
- Cod. 220200 Antisiero Micro Proteine Urinarie (2ml)
- Cod. 220300 Antisiero Macro Proteine Urinarie (2ml)
- Cod. 220400 Antisiero Proteine GAM (2ml)
- Cod. 220700 Antisiero Catene Kappa libere e legate (2ml)
- Cod. 220800 Antisiero Catene Lambda libere e legate (2ml)
- Cod. 220500 Antisiero Catene Kappa libere (2ml)
- Cod. 220600 Antisiero Catene Lambda libere (2ml)
- Cod. 220900 Antisiero Urine Pentavalente/Albumina (2ml)
- Cod. 221000 Antisiero Urine Pentavalente (2ml)
- Cod. 9249 Antisiero IgD
- Cod. 9250 Antisiero IgE
- Cod. 9400 Controllo IFE

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Si consiglia di utilizzare siero fresco.

I campioni possono essere anche conservati come segue:

- 4 giorni a 15...30°C
- 2 settimane a 2...6°C
- 6 mesi a -20°C

I campioni di urine possono essere applicati interi. I campioni di siero possono essere diluiti con il diluente, secondo la seguente tabella:

Concentrazione Monoclonale	Linea SP	G, A, M, K, λ
>3 g/L	1+2	Intero
3-10 g/L	1+2	1+4
10-25 g/L	1+2	1+9
25-50 g/L	1+2	1+19

PROCEDURA

1. Pipettare 35 μ L di ogni campione nelle apposite cuvette portacampioni SAS-I.
- i) **Solo per SAS-I e SAS-I Plus:** Posizionare gentilmente il portacampioni nel cassetto dell'applicatore.
- ii) **Solo per SAS-3:** Collocare con cautela il vassoio per campioni utilizzando i fermi di posizionamento della base di campioni. Assicurarsi che il vassoio sia posizionato saldamente.
2. Rimuovere il gel dalla confezione e:
 - i) **Solo per SAS-I:** Collocarlo il gel nel SAS-I, con il lato di agarsoio rivolto verso l'alto, allineando il polo positivo e negativo con i rispettivi lati di polarità.
 - ii) **Solo per SAS-I Plus:** Distribuire 400 μ L di preparazione REP sul dissipatore di calore. Collocare il gel sul dissipatore di calore con agarsoio rivolto verso l'alto, allineando il polo positivo e negativo con i rispettivi lati di polarità, prestando attenzione ad evitare bolle d'aria sotto il gel.
 - iii) **Solo per SAS-3:** Collocare la guida di allineamento sui fermi e distribuire 400 μ L di preparazione REP sul centro della camera. Collocare il gel nella camera con l'agarsoio rivolto verso l'alto; utilizzando la guida, allineare i lati positivo e negativo rispetto ai corrispondenti puntali degli elettrodi, prestando attenzione ad evitare bolle d'aria sotto il gel.
3. Asciugare la superficie del gel con un blotter C, poi scartarlo.
4. i) **Solo per SAS-I:** Posizionare gli elettrodi nella parte superiore dei blocchi magnetici in modo da creare un contatto con i ponti.
 - ii) **Solo per SAS-I Plus:** (come sopra). Sistemare il coperchio sul gel e sugli elettrodi e premere con decisione per 5 secondi per consentire il contatto.
 - iii) **Solo per SAS-3:** Posizionare gli elettrodi nella parte all'interno dei blocchi magnetici in modo da creare un contatto con i ponti.
5. Collocare 2 applicatori nelle apposite scanalature, che si trovano nella parte frontale del pannello del instrument. (**Solo per SAS-3:** Slot A e I0).
6. Realizzi dell'elettroforesi delle immunofissazione:
 - i) **Solo per SAS-I:** 80 Volts, 20 Minuti.
 - ii) **Solo per SAS-I Plus:** Elettroforesi: 100 Volts, 18 minuti, 20°C
 Incubation passaggio 1: 8 minuti, 37°C (Incubation)
 Incubation passaggio 2: 8 minuti, 40°C (D Asciugare)
 - iii) **Solo per SAS-3:**

Passo	Tempo (mm:ss)	Temp (°C)	Voltaggio	Altro
Caricamento campione	00:30	21		Velocità I
Applicazione campione	00:30	21		Velocità I*
Elettroforesi	17:00	21	100	
Applicazione antisieri	10:00	21		
Inserimento pettini	02:00	21		
Blotter D	05:00	40		
Dry	08:00			

- * Utilizzare la posizione 2.

NOTE: Per l'immunofissazione del siero, è necessaria 1 applicazione del campione. Per l'immunofissazione delle urine, sono necessarie 10 applicazioni. Rimuovere i blocchi di gel prima dell'essiccazione.

7. Alla termine dell'elettroforesi, (**Solo per SAS-I Plus**: rimuovere il coperchio), rimuovere gli elettrodi dalla superficie del gel. (**Solo per SAS-3**: rimuovere la guida di allineamento). Posizionare la maschera per l'applicazione degli antisieri sulla superficie del gel: **NOTE**: I canali fresati della maschera per l'applicazione degli antisieri dovrebbero essere allineati centralmente sopra alla serigrafia del gel, nei quali sono stati applicati i campioni.
8. Applicare 2 gocce (oppure 50 microlitri) di Fissante Proteico (per IFE siero) oppure di antisiero totale (per IFE urine) all'interno del foro della linea SP e 2 gocce (oppure 50 microlitri) dell'appropriato antisero all'interno dei fori delle linee delle immunoglobuline.
Assicurarsi che il fissante e gli antisieri abbiano riempito completamente i canali.
9. Incubare il gel. (**Solo per SAS-I**: Incubare a 15...30°C).
10. Al termine del periodo di incubazione, collocare 1 pettinino di carta nei fori della maschera per l'applicazione degli antisieri. Lasciare assorbire per 2 minuti per eliminare l'eccesso di antisiero. Quindi rimuovere il pettinino di carta e la maschera di applicazione degli antisieri dalla superficie del gel.
11. **i) Solo per SAS-I**: Rimuovere entrambi i ponti di gel utilizzando l'apposito "Rimuovi ponti di gel". Collocare il gel in una vaschetta contenente soluzione de lavaggio per 5 minuti agitando lentamente.
ii) Solo per SAS-I Plus e SAS-3: Collocare un blotter D (con il lato liscio rivolto verso il basso) sulla superficie del gel, vada per 10 secondi e rimuova.
12. **i) Solo per SAS-I**: Collocare il gel su un blotter D con l'agarosio rivolto verso l'alto. Porre un blotter B, inumidito in soluzione de lavaggio, sulla superficie del gel e subito dopo un blotter X. Premere il gel usare il Peso di Sviluppo per 10 minuti.
ii) Solo per SAS-I Plus e SAS-3: Collocare un blotter D (con il lato liscio rivolto verso il basso) sulla superficie del gel. Lasciare il blotter sulla superficie del gel. Rimettere a posto la maschera per l'applicazione degli antisieri, avvolgendola con della carta.
13. **i) Solo per SAS-I**: Rimuovere quindi peso e blotter e collocare il gel in una vaschetta contenente soluzione de lavaggio per 4 minuti agitando lentamente.
ii) Solo per SAS-I Plus e SAS-3: Rimuovere il blotter D.
14. **i) Solo per SAS-I**: Rimuovere il gel dalla soluzione de lavaggio, collocarlo su un blotter D con l'agarosio verso l'alto. Porre un blotter B inumidito in soluzione de lavaggio sulla superficie del gel seguito da un blotter D. Premere per 3 minuto usa il peso di sviluppo).
ii) Solo per SAS-I Plus e SAS-3: Rimuovere entrambi i ponti di gel utilizzando l'apposito "Rimuovi ponti di gel". Passi al punto 16.
15. **Solo per SAS-I**: Rimuovere il blotter D.
NOTE: Immediatamente dopo l'uso, lavare la maschera per l'applicazione degli antisieri con un blando disinfettante. Se possibile pulire il fondo della mascherina con uno spazzolino oppure con un piccolo pennello. Non lasciare asciugare gli antisieri sulla mascherina. L'accumulo degli antisieri sulla superficie della mascherina può dare origine alla formazione di bolle d'aria durante la fase di applicazione degli antisieri. Asciugare completamente la maschera per l'applicazione degli antisieri. L'acqua lasciata nei canali potrebbe impedire una corretta applicazione degli antisieri. Conservare la maschera capovolta, per aumentare la circolazione dell'aria consentendone così l'asciugatura.
16. Fissarlo il gel al supporto della camera di colorazione.

17. Selezionare il programma IFE.

a) SAS-2 (Colorazione Automatica)

Passaggio	Soluzione	Tempo (mm:ss)	Numero di Porta	Temp (°C)
Asciugatura	—	10:00		55
Lavaggio	Soluzione della lavata	07:00	4	
Colorazione	Acido Viola	03:00	5	
Decolorazione	Soluzione decolorante	02:00	2	
Asciugatura	—	05:00		65
Lavaggio	Soluzione della lavata	03:00	4	
Lavaggio	Soluzione della lavata	03:00	4	
Asciugatura	—	05:00		65

a) SAS-4 (Colorazione Automatica)

Passo	Tempo (mm:ss)	Temp (°C)	Altro
Lavaggio 1	00:30		Ricircolo ON
Lavaggio 2	10:00		Ricircolo ON
Colorante	04:00		Ricircolo ON
Decolorante	02:00		Ricircolo ON
Decolorante	02:00		Ricircolo ON
Asciugatura	12:00	63	

c) Procedura Manuale

Seguendo la sequenza della camera di colorazione: fissare, colorare, decolorare, lavare, e al termine asciugare il gel in una stufa da laboratorio con aria forzata 60...70°C.

18. I termine del ciclo di colorazione, rimuovere il gel dalla camera. Il gel è ora pronto per essere esaminato.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La maggior parte delle proteine monoclonali migra nella zona catodica (gamma) del tracciato proteico, in quanto anomale possono migrare ovunque nel tracciato.

Nel tracciato immunofissato, la banda monoclonale occuperà la stessa posizione di migrazione e avrà la stessa conformazione della corrispondente banda monoclonale del tracciato di riferimento. La proteina patologica viene fissata dall'antisiero corrispondente che viene utilizzato.

Dove sono presenti basse concentrazioni di proteine patologiche, le bande possono apparire senza le normali immunoglobuline policlonali.

La pubblicazione "Immunofixation for the Identification of Monoclonal Gammopathies" è disponibile dal Helena BioSciences, su richiesta.

IMMUNOFISSAZIONE URINE:

Tipo di Proteinuria	Bande osservate nel gel	Proteine presenti
Urina normale	Piccola banda di albumina	albumina
Glomerulare	Albumina, alfa-1 Beta, gamma	albumina, alfa1 antitripsina transferrina, gammaglobuline
Tubulare	Alfa 1, alfa2, beta	Proteina legante il retinolo, beta2-globulina, alfa2 microglobulina
Aumento Immunoglobuline	gamma variabile	catene leggere libere

LIMITI

1. Eccesso di antigene

Solitamente nelle IFE l'eccesso di antigene è dovuto per l'elevata concentrazione delle immunoglobuline nel campione del paziente. Si evidenzia come una mancanza di colore al centro della banda immunofissata che risulta invece più colorata ai margini. Questo viene identificato come prozona. In tal caso si rende necessario aumentare la diluizione del campione.

2. Precipitazione non-specifica in tutte le finestre di immunoglobuline.

Occasionalmente le piastre di IFE presentano delle bande di precipitazione nella stessa posizione in tutte le finestre.

Questo può essere causato da:

a) **IgM monoclonali che aderiscono alla matrice di gel comparando in tutte e cinque le reazioni anticorpali.**

Dove però l'immunoglobulina reagisce con l'antisiero specifico sia per le catene pesanti che per le leggere. La banda risulta più netta e colorata delle altre, facilitandone così l'identificazione. Aumentando la diluizione si migliora la distinzione tra la reazione specifica degli anticorpi delle IgM, dalle altre non specifiche.

b) **Alta titolazione di Fattori reumatoidi o Immunocomplessi.**

Campioni con alto titolo di fattori reumatoidi o di immunocomplessi possono mostrare un precipitato nel punto di applicazione.

Questa reazione non specifica si può eliminare riducendo il campione con DTT o β -2 mercaptoetanolo (Miscelare 190 μ l di siero diluito con 10 μ l di soluzione al 1% di DTT, preparata con soluzione fisiologica allo 0.85% o miscelare 100 μ l di siero con 10 μ l di una soluzione di β -2 mercaptoetanolo diluita 1:10 con acqua.

c) **Fibrinogeno.**

Se il fibrinogeno è presente nel campione analizzato si avranno delle bande in tutte le finestre. Solitamente è presente nei pazienti in terapia anticoagulante.

3. Reazioni in Kappa e Lamda ma non nelle catene pesanti.

I campioni in cui si verifica questa situazione possono avere catene libere e leggere (gammopatia monoclonale) o possono avere proteine monoclonali IgD o IgE. In questo caso ripetere l'immunofissazione sostituendo gli antisieri IgD e IgE agli antisieri delle catene pesanti (IgG / A/M). Se non si hanno reazioni di precipitazione si può parlare di malattie delle catene leggere.

4. Banda in regione gamma senza reazione con antisieri specifici.

Si verifica in pazienti che hanno il valore di Proteina C (CRP) elevato¹²⁻¹³, per pazienti che presentano dei chilomicroni nel siero o in campioni che sono stati congelati.

5. Antisieri che non reagiscono con Kappa e Lambda.

In questo caso bisogna eliminare: a) le catene pesanti; b) alte concentrazioni di catene leggere per evitare un eccesso di antigene; c) basse concentrazioni di catene leggere; d) atipiche molecole di catene leggere che non reagiscono con gli antisieri; e) catene leggere con nascoste catene leggere determinanti (come a volte si vede con IgA e IgD). Per ottenere un risultato definitivo puoi includere nel test: a) alte o basse diluizioni del campione per ottimizzare l'equivalenza tra anticorpo e antigene; b) l'utilizzo di antisieri più specifici per l'identificazione di immunoglobuline atipiche e c) trattare il campione con β -2-mercaptoetanolo per rilevare le catene leggere.

PERFORMANCE

Una serie di campioni sono stati testati e comparati con altri kit disponibili in commercio - entrambi i kits hanno mostrato risultati equivalenti.

Il controllo del siero Kemtrol anomalo Helena Biosciences (Cod. 7025) può essere diluito in un rapporto di 1 a 100 e utilizzato come controllo positivo per IFE per urina.

BIBLIOGRAFIA:

1. Fauchier, P. and Catalan, F. 'Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis' Alfred Fournier Institute, Paris, France, 1988.
2. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. and Tyllia, M.M. 'Finding Clues to Disease in Urine' Diagnostic Medicine, 1980 ; May/June : 69-75.
3. Umbreit, A. and Wiedemann, G. 'Determination of Urinary Protein Fractions. A Comparison With Different Electrophoretic Methods and Quantitatively Determined Protein Concentrations' Clin. Chim. Acta., 2000; 297 : 163-172.
4. Wiedemann, G. and Umbreit, A. 'Determination of Urinary Protein Fractions by Different Electrophoretic Methods', Clin. Lab.; 1999, 45 : 257-262.
5. Wong, W.K., Wieringa, G.E., Stec, Z., Russell, J., Cooke, S., Keevil, B.G. and Lockhart, S. 'A Comparison of Three Procedures for the Detection of Bence-Jones Proteinuria' Ann. Clin. Biochem., 1997, 34 : 371-374.
6. Afonso, E., 'Quantitation Immunoelectrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
7. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox. Sang., 1969; 17 : 445-452.
8. Alper, C.A., 'Genetic Polymorphism of Complement Components as a Probe of Structure and Function', Progress in Immunology. First International Congress of Immunology. 1971 : 609-624, Academic Press, New York.

9. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of Alpha(1)-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of Pi M.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
10. Cawley, L.P., Minard, B.J, Tourtellotte, W.W., Ma, B.I. and Chelle, C., 'Immunofixation Electrophoretic Technique Applied to Identification of Proteins in Serum and Cerebrospinal Fluid', Clin. Chem., 1976; 22 : 1262-1268.
11. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976; 22 : 1982-1985.
12. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B. and Franzen, B., 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25 (4) : 629-638.
13. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. and Tyllia, M.M., 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

USO PREVISTO

El kit IFE de SAS-I tiene como objeto la separación e identificación de gammapatías monoclonales por electroforesis con gel de agarosa.

La inmunofijación (IFE) es un procedimiento en dos etapas aplicando electroforesis en agarosa de alta resolución en la primera etapa e inmunoprecipitación en la segunda.

La mayor demanda de IFE se da en los laboratorios clínicos, donde es utilizada principalmente para la detección de gammapatías monoclonales. Una gammapatía monoclonal es un estado de enfermedad primario en el que un solo clon de células de plasma produce elevados niveles de una inmunoglobulina de una sola clase y tipo. Tales inmunoglobulinas son conocidas como proteínas monoclonales, proteínas M o paraproteínas. Su presencia puede ser de naturaleza benigna o tener un significado incierto. En algunos casos, son de naturaleza maligna, como el mieloma múltiple o la macroglobulinemia de Waldenström. Hay que establecer una diferencia entre gammapatías policlonales y monoclonales, ya que las gammapatías policlonales son un estado de enfermedad secundario debido a desórdenes clínicos tales como enfermedad crónica del hígado, desórdenes de colágenos, artritis reumatoide e infecciones crónicas.

Las proteínas de la orina proceden principalmente de proteínas plasmáticas que se filtran a través del riñón. La aparición de proteínas plasmáticas anormales en la orina tiene un gran valor para la evaluación de las funciones renales. Un estudio adecuado de la proteinuria debiera incluir una valoración cuantitativa y cualitativa del tipo y cantidad de proteínas excretadas¹⁻⁵. La combinación de la separación electroforética de proteínas de la orina unida a la identificación de tipos específicos de proteínas mediante inmunoprecipitación, permite diferenciar varios tipos de proteinuria - fisiológica, glomerular (selectiva y no selectiva), tubular y proteinuria asociada con disglubulinemias¹⁻⁵.

Alfonso fue el primero en describir la inmunofijación en la literatura, en 1964⁶. Alper y Johnson publicaron un procedimiento más práctico en 1969 y luego publicaron varios estudios utilizando esta técnica^{7,9}. La inmunofijación ha estado siendo utilizada como procedimiento para la investigación de inmunoglobulinas desde 1976¹⁰⁻¹¹.

El kit IFE de SAS-I separa las seroproteínas según la carga en un gel de agarosa. Luego las proteínas son incubadas con antisuero monoespecífico, lavadas y coloreadas para permitir la visualización del inmunoprecipitado para obtener una interpretación cualitativa.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Todos los reactivos son para utilizar únicamente en diagnóstico in vitro. No ingerir ni aspirar por la boca ningún componente del kit. Utilizar guantes para manipular los componentes del kit. Consultar en el prospecto de seguridad del producto las indicaciones sobre riesgos y seguridad así como la información acerca de su eliminación.

COMPOSICION

1. Gel de IFE SAS-I.

Contiene agarosa en un tampón de Tris-Barbital, con Tiomersal y acida de sodio como conservantes. El gel viene envasado listo para usar.

2. Colorante violeta ácido concentrado.

Contiene colorante violeta ácido concentrado. Diluir el contenido del frasco en 700ml de agua destilada. Dejar agitando durante toda la noche y filtrarlo antes del uso. Guardar el colorante en un frasco herméticamente cerrado.

3. Solución decolorante concentrada.

Diluya el contenido de decolorante A en 1 litro de agua destilada. A continuación, añada el contenido de decolorante B y añada lentamente un poco más de 1 litro de agua destilada.

4. Solución de lavado.

Contiene 100ml de una solución concentrada de lavado. Diluir 20ml en 1 litro de una solución salina.

5. Solución diluyente de muestras.

Contiene de concentrado tampón de Tris / Barbital con azul de bromofenol y acida de sodio como conservante. El diluyente viene envasado listo para usar.

6. Kit de antisuero IFE SAS-I.

Contiene un fijador de proteínas SP (conteniendo ácido acético y ácido sulfosalicílico) y antisuero monoespecifico para inmunoglobulinas humanas - IgG, IgA, IgM, cadenas ligeras kappa (libre y combinada) y cadenas ligeras lambda (libre y combinada). Todos los antisueros contienen de acida de sodio como conservante. El antisuero viene envasado listo para usar.

7. Otros componentes del kit.

Cada kit contiene una hoja de instrucciones y secantes C, D y peines hasta completar 10 geles.

ALMACENAMIENTO Y VIDA UTIL DE ALMACENAJE

1. Gel de IFE SAS-I.

Los geles deben guardarse a una temperatura entre 15...30°C y son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. NO REFRIGERAR NI CONGELAR. El deterioro del gel puede ser indicado por: 1) aspecto cristalino, indicio de que el gel se ha congelado, 2) agrietamiento y exfoliación, indicio de que el gel se ha secado, o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas.

2. Colorante violeta ácido.

El colorante concentrado debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. La solución colorante preparada es estable durante 6 meses a una temperatura entre 15...30°C. Es aconsejable desechar inmediatamente el colorante usado para prevenir el agotamiento de su capacidad de coloración. Unos malos resultados de coloración pueden ser indicio de deterioro de la solución colorante.

3. Solución decolorante.

El decolorante concentrado debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. La solución decolorante diluida es estable durante 6 meses a una temperatura entre 15...30°C.

4. Solución de lavado.

El solución de lavado debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. La solución de lavado diluida es estable durante 6 meses a una temperatura entre 15...30°C. La aparición de turbidez puede ser indicio de deterioro.

5. Solución diluyente de muestras.

El solución diluyente de muestras debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. La aparición de turbidez puede ser indicio de deterioro.

6. Kit de antisuero IFE SAS-I.

El kit de antisuero debe guardarse a una temperatura entre 2...6°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Turbiedad o contaminación por partículas pueden ser indicios de deterioro.

ACCESORIOS NECESARIOS, NO SUMINISTRADOS

nº de catálogo 210200 Aplicadores de muestras 1 x 10

nº de catálogo 210300 Aplicadores de muestras 5 x 10

nº de catálogo 210100 Vasos de recogida de muestras desechables 100

nº de catálogo 5014 peso de laboratorio (2.3kg)

nº de catálogo 3100 REP Prep

Horno con aire a presión capaz de alcanzar 70°C.

Solución salina (NaCl al 0,85%)

Los siguientes productos no son necesarios para el IFE de suero estándar, pero podrían necesitarse para posteriores investigaciones y para la investigación del IFE de la orina:

nº de catálogo 220100 Antisuero para proteínas totales de orina humana (2ml)

nº de catálogo 220200 Antisuero para microproteínas de orina humana (2ml)

nº de catálogo 220300 Antisuero para macroproteínas de orina humana (2ml)

nº de catálogo 220400 Antisuero para proteínas GAM humanas (2ml)

nº de catálogo 220700 Antisuero para cadena ligera humana kappa suelta y unida (2ml)

nº de catálogo 220800 Antisuero para cadena ligera humana lambda suelta y unida (2ml)

nº de catálogo 220500 Antisuero para cadena ligera humana kappa suelta (2ml)

nº de catálogo 220600 Antisuero para cadena ligera humana lambda suelta (2ml)

nº de catálogo 220900 Antisuero para pentavalente / albúmina de orina humana (2ml)

nº de catálogo 221000 Antisuero para pentavalente de orina humana (2ml)

nº de catálogo 9249 Antisuero para IgD humano

nº de catálogo 9250 Antisuero para IgE humano

nº de catálogo 9400 Kit de control IFE

RECOGIDA Y PREPARACION DE MUESTRAS

La muestra consistirá en suero recién obtenido. Las muestras se pueden guardar hasta 4 días a una temperatura entre 15...30°C, hasta 2 semanas entre 2...6°C, o 6 meses a -20°C⁶.

Las muestras de orina deben aplicarse puras, sin mezclar. Las muestras de suero se diluirán de acuerdo con la tabla siguiente, utilizando el diluyente de muestras:

Concentración monoclonal	Línea SP	G, A, M, K, λ
> 3 g/L	1+2	Pura
3 a 10 g/L	1+2	1+4
10 a 25 g/L	1+2	1+9
25 a 50 g/L	1+2	1+19

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

- Con una pipeta, introducir 35µl de la muestra en la cavidad correspondiente de la bandeja de muestras SAS-I o en vasos de recogida de muestras desechables.
 - Solo para SAS-I y SAS-I Plus:** Colocar cuidadosamente la bandeja con la muestra en la gaveta del aplicador. Asegurarse de que la bandeja está firmemente introducida en su posición. Procurar asegurar la correcta alineación de la bandeja con la muestra dentro de la gaveta.
 - Solo para SAS-3:** Colocar cuidadosamente la bandeja con la muestra utilizando los pasadores de localización de la base de la muestra. Asegurar que la bandeja está en una posición segura.
- Sacar el gel del envase y:
 - Solo para SAS-I:** colocarlo en el SAS-I, con la agarosa hacia arriba, alineando los lados positivo y negativo con los bornes de los electrodos correspondientes.
 - Solo para SAS-I Plus:** pipetear 400µL de REP Prep en el disipador térmico. Colocar el gel en el disipador térmico, con el lado de agarosa hacia arriba, alineando los lados positivo y negativo con los bornes de los electrodos correspondientes, teniendo cuidado de evitar las burbujas aéreas debajo del gel.
 - Solo para 3:** colocar la guía de alineación en los pasadores y pipetear 400µL de REP Prep en el centro de la cámara. Colocar el gel en la cámara con la agarosa hacia arriba, utilizar la guía para alinear los lados positivo y negativo con los bordes, teniendo cuidado de evitar las burbujas aéreas debajo del gel.
- Secar la superficie del gel con un secante C y luego desechar el secante.
- Solo para SAS-I:** Conectar los electrodos a la parte superior de los bornes, de forma que estén en contacto con los bloques tampón.
 - Solo para SAS-I Plus:** (igual que el anterior). Colocar la cubierta del gel sobre el gel y los electrodos, presionar con firmeza durante 5 segundos para asegurar un buen contacto.
 - Solo para SAS-3:** Conectar los electrodos a la parte superior de los bornes, de forma que estén en contacto con los bloques tampón.
- Colocar dos juegos de aplicadores en posición en el instrumento. (**Solo para SAS-3:** ranuras A y 10).
- Realizar la electroforesis de la inmunofijación:
 - Solo para SAS-I:** 80 voltios, 20 minutos
 - Solo para SAS-I Plus:** Electroforesis: 100 Volts, 18 minutos, 20°C
Incubation el paso 1: 8 minutos, 37°C (Incubation)
Incubation el paso 2: 8 minutos, 40°C (D Secar)

iii) Solo para SAS-3:

Paso	Tiempo (mm:ss.)	Temperatura (°C)	Voltaje	Otros
Cargar muestra	00:30	21		Velocidad I
Aplicar muestra	00:30	21		Velocidad I*
Electroforesis	17:00	21	100	
Aplicar antisuero	10:00	21		
Insertar peine	02:00	21		
Secante D	05:00	40		
Secar	08:00	54		

* Utilizar la posición 2

NOTA: Para la inmunofijación del suero, se necesita 1 aplicación de la muestra. Para la inmunofijación de la orina, son necesarias 10 aplicaciones de la muestra. Retirar los bloques de gel antes del secado.

7. Finalizada la electroforesis, (**Solo para SAS-I Plus:** retirar la cubierta), retirar los electrodos de la superficie del gel (**Solo para SAS-3:** retirar la guía de alineación), y colocar la plantilla de aplicación del antisuero sobre la superficie del gel. **NOTA:** Los canales fresados de antisuero deben alinearse centrados sobre el molde impreso en el gel en el que se aplican las muestras.
8. Applicare 2 gocce (oppure 50 microlitri) di Fissante Proteico (per IFE siero) oppure di antisiero totale (per IFE urine) all'interno del foro della linea SP e 2 gocce (oppure 50 microlitri) dell'appropriato antisiero all'interno dei fori delle linee delle immunoglobuline. Assicurarsi che il fissante e gli antisieri abbiano riempito completamente i canali.
9. Incubar el gel. (**Solo para SAS-I:** Incubar a 15...30°C).
10. Finalizada la fase de incubación, colocar un peine secante en los agujeros inferiores de la plantilla de antisuero. Aguardar 2 minutos a que el antisuero sobrante sea absorbido y luego retirar los peines secantes y la plantilla de la superficie del gel.
11. **i) Solo para SAS-I:** Retirar ambos bloques de gel utilizando el extractor de bloques de gel. Colocar el gel en una solución de lavado durante 5 minutos, agitando suavemente.
ii) Solo para SAS-I Plus y SAS-3: Colocar un secante D (la cara lisa para abajo) sobre la superficie del gel, váyase por 10 segundos y quite.
12. **i) Solo para SAS-I:** Colocar el gel en un secante D con la agarosa hacia arriba. Colocar un secante B (humedecido en solución de lavado) del gel y a continuación un secante X. Presionar el gel en un peso de desarroyo durante 10 minutos.
ii) Solo para SAS-I Plus y SAS-3: Colocar un secante D (la cara lisa para abajo) sobre la superficie del gel y sustituir la plantilla del antisuero para mantener el secante plano. Secar el gel.
13. **i) Solo para SAS-I:** Quitar los secantes y colocar el gel en una solución de lavado durante 4 minutos, agitando suavemente.
ii) Solo para SAS-I Plus y SAS-3: Retirar el secante D.
14. **i) Solo para SAS-I:** Retirar el gel de la solución de lavado y colocarlo sobre un secante D con la agarosa hacia arriba. Poner un secante B (humedecido en la solución de lavado) sobre la superficie del gel y a continuación un secante D. Presionar el gel en un peso de desarroyo durante 3 minutos).
ii) Solo para SAS-I Plus y SAS-3: Retirar ambos bloques de gel utilizando el extractor de bloques de gel. Vaya al paso 16.

15. **Solo para SAS-I:** Retirar los secantes.

NOTA: Inmediatamente después de su uso, limpiar la plantilla de antisuero con un detergente biocida suave. Si es posible, frotar la base de la plantilla con un cepillo dental o con un escobillón pequeño para tubos de ensayo. No dejar que el antisuero se seque sobre la plantilla. La acumulación de antisuero sobre la superficie de la plantilla provocará la formación de burbujas durante la fase de aplicación del antisuero. Secar completamente la plantilla del antisuero. El agua dejada en los agujeros impedirá que se pueda aplicar el antisuero para el siguiente uso. Guardar la plantilla con la cara superior hacia abajo para aumentar la circulación de aire y, de esta forma, el secado potencial del aplicador.

16. Sujetarlo el gel al soporte de la cámara de coloración.

17. Seleccionar el programa de pruebas IFE en la unidad de coloración y, siguiendo las indicaciones, colorear y secar el gel.

a) **SAS-2 (Colorador automático):**

Paso	Solución	Tiempo (mm:ss)	Orificio	Temp (°C)
Secar	—	10:00		55
Lavar	Solución de la colada	07:00	4	
Colorar	Colorante violeta ácido	03:00	5	
Decolorar	Solución decolorante	02:00	2	
Secar	—	05:00		65
Lavar	Solución de la colada	03:00	4	
Lavar	Solución de la colada	03:00	4	
Secar	—	05:00		65

b) **SAS-4 (Colorador automático):**

Paso	Tiempo (mm:ss.)	Temperatura (°C)	Otros
Lavado 1	00:03		Recirculación activada
Lavado 2	10:00		Recirculación activada
Colorar	04:00		Recirculación activada
Decolorar	02:00		Recirculación activada
Decolorar	02:00		Recirculación activada
Secar	12:00	63	

c) **Manual:**

Seguir la secuencia indicada para el colorador automático, utilizando un baño de coloración para los pasos de fijar, colorear, decolorar y lavar, y un horno de secado por aire a presión a una temperatura de 60...70°C para los pasos de secado.

18. Finalizado el ciclo de coloración, sacar el gel de la cámara de coloración. Ahora el gel está listo para examinar.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

La mayoría de las proteínas monoclonales migran en la región gamma, catódica, del patrón proteínico, aunque debido a su naturaleza anormal pueden migrar a cualquier lugar dentro de la región globulínica durante la electroforesis proteínica. La banda proteínica monoclonal en el patrón de inmunofijación ocupará la misma posición y forma que la banda anormal en el patrón seroproteínico. La proteína anormal es identificada por la forma en que reacciona con ella el tipo de antisuero específico.

Cuando existen bajas concentraciones de proteínas anormales, la banda anormal puede aparecer como una banda dentro de la inmunoglobulina policlonal normal. También se puede observar una banda dentro de un fondo policlonal cuando también se da una fuerte presencia de inmunoglobulina policlonal.

Bajo pedido, Helena Biosciences puede suministrar la publicación 'Immunofixation for the Identification of Monoclonal Gammopathies'.

Inmunofijación de la orina:

Tipo de proteinuria	Bandas observadas en el gel	Proteínas presentes
Orina normal	Pequeña banda de albúmina	Albúmina
Glomerular	Albúmina, alfa-1, beta, gamma	Albúmina, alfa-1, antitripsina, transferina, gammaglobulinas
Tubular	Alfa-1, alfa-2, beta	Proteínas ligadas con retinol, beta2-microglobulina, alfa2-microglobulina.
Exceso	Gamma o variable	Inmunoglobulinas, cadenas ligeras sueltas.

LIMITACIONES**1. Exceso de antígeno.**

Se produce un exceso de antígeno cuando no hay anticuerpos ligeramente en exceso o una equivalencia antígeno / anticuerpo en el lugar de la precipitación. El exceso de antígeno en IFE suele deberse a un exceso de inmunoglobulina en la muestra del paciente. El exceso de antígeno está caracterizado por la aparición de efectos de zona (zonas sin colorear en el centro de la banda proteínica inmunofijada, con coloración alrededor de los bordes). En este caso, deberá utilizarse una dilución mayor de la muestra para optimizar la concentración de inmunoglobulina.

2. Precipitación no específica en todas las líneas de inmunoglobulinas.

De vez en cuando, una placa IFE terminada exhibe una banda de precipitado en la misma posición en cada una de las calles de la placa. Esto puede ser el resultado de:

a) Inmunoglobulinas monoclonales IgM.

Las proteínas monoclonales IgM se pueden adherir a la matriz del gel. En 5 de las líneas de antisuero del gel aparecerá una banda. Sin embargo, donde la banda reacciona con un antisuero específico tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera, habrá un incremento en el tamaño y en la intensidad de coloración de la banda, permitiendo identificar el tipo de inmunoglobulina. La dilución adicional de la muestra permitirá mejorar la discriminación entre la reacción del anticuerpo IgM y la coloración no específica de la proteína IgM precipitada en las otras líneas, simplificando el diagnóstico.

b) Altas concentraciones de FR o complejos inmunes.

Las muestras con altas concentraciones de factor reumatoide (FR) u otros complejos inmunes pueden mostrar una banda de precipitado en el punto de aplicación de la muestra. Reduciendo la muestra con DTT o β -2-mercaptoetanol se puede eliminar esta reacción no específica (mezclar 190 μ l de suero diluido con 10 μ l de un 1% (w/v) de DTT en un 0,85% de solución salina, o mezclar 100 μ l de suero con 10 μ l de una dilución 1:10 de β -2-mercaptoetanol en agua. Ejecutar el IFE de la forma usual. NOTA: trabajar siempre en una campana de humos cuando se utilice el β -2-mercaptoetanol).

c) Fibrinógeno.

El fibrinógeno, cuando está presente en la muestra, mostrará una especie de banda discreta en todas las líneas del patrón de inmunofijación. El fibrinógeno está presente en el plasma y, algunas veces, en el suero de pacientes a los que se está aplicando una terapia anticoagulante.

3. Reacción con la cadena ligera de antisuero kappa o lambda, pero no reacción con la cadena fuerte de antisuero IgG, IgA o IgM.

Las muestras que presentan este patrón pueden tener una gammapatía monoclonal de cadena ligera libre o bien una proteína monoclonal IgD o IgE. En este caso, deberá repetirse la IFE, sustituyendo el antisuero IgD e IgE por dos de los otros antisueros de cadena pesada. El fracaso en la obtención de una reacción con antisuero IgD o IgE será un indicio de enfermedad de cadena ligera libre.

4. Banda en la región gamma sin mostrar reactividad con antisuero IFE.

La proteína C reactiva (PCR) puede ser detectada en pacientes con una respuesta inflamatoria aguda¹²⁻¹³. La PCR aparece en forma de banda estrecha en el extremo catódico del patrón de la seroproteína. Concentraciones elevadas de alfa-antitripsina y haptoglobina son una clara evidencia de PCR. Los pacientes con una banda de PCR tendrán probablemente un elevado nivel al realizar los análisis de PCR. A veces, puede ser vista una banda estrecha en el punto de aplicación de la muestra, que puede estar causada por quilomicrones en el suero o proteínas precipitadas en muestras que se han guardado congeladas.

5. No reactividad con antisuero kappa y lambda.

A veces, una muestra tendrá una reacción con un antisuero de cadena pesada, pero no una reacción de cadena ligera, obviamente. En tal caso, será necesario descartar las siguientes posibilidades: a) enfermedad de cadena pesada, b) concentraciones muy altas de cadenas ligeras, conduciendo a un efecto de zona por exceso de antígeno, c) bajas concentraciones de cadenas ligeras, d) molécula atípica de cadena ligera que no reacciona con el antisuero, e) cadenas ligeras con determinantes de cadenas ligeras "ocultos" (como se ven a veces con IgA e IgD). Para obtener unos resultados definitivos, el ensayo puede incluir: a) una mayor o menor dilución de la muestra para optimizar la equivalencia anticuerpo / antígeno, b) antisuero de otros fabricantes para ayudar en la identificación de inmunoglobulinas atípicas y c) tratar la muestra con β -2-mercaptoetanol para "revelar" las cadenas ligeras.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Se probó una serie de muestras, y al compararla con otro kit comercial disponible, ambos presentaron resultados equivalentes.

El control de suero anormal Kemtrol de Helena Biosciences (N.º Cat. 7025) puede diluirse en una proporción 1 en 100 y usarse como control positivo para el IFE de Orina.

BIBIOGRAFIA

1. Fauchier, P. and Catalan, F. 'Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis' Alfred Fournier Institute, Paris, France, 1988.
2. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. and Tyllia, M.M. 'Finding Clues to Disease in Urine' Diagnostic Medicine, 1980 ; May/June : 69-75.
3. Umbreit, A. and Wiedemann, G. 'Determination of Urinary Protein Fractions. A Comparison With Different Electrophoretic Methods and Quantitatively Determined Protein Concentrations' Clin. Chim. Acta., 2000; 297 : 163-172.
4. Wiedemann, G. and Umbreit, A. 'Determination of Urinary Protein Fractions by Different Electrophoretic Methods', Clin. Lab.; 1999, 45 : 257-262.
5. Wong, W.K., Wieringa, G.E., Stec, Z., Russell, J., Cooke, S., Keevil, B.G. and Lockhart, S. 'A Comparison of Three Procedures for the Detection of Bence-Jones Proteinuria' Ann. Clin. Biochem., 1997, 34 : 371-374.
6. Afonso, E., 'Quantitation Immunoelectrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
7. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox. Sang., 1969; 17 : 445-452.
8. Alper, C.A., 'Genetic Polymorphism of Complement Components as a Probe of Structure and Function', Progress in Immunology. First International Congress of Immunology. 1971 : 609-624, Academic Press, New York.
9. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of Alpha(1)-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of Pi M.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
10. Cawley, L.P., Minard, B.J, Tourtellotte, W.W., Ma, B.I. and Chelle, C., 'Immunofixation Electrophoretic Technique Applied to Identification of Proteins in Serum and Cerebrospinal Fluid', Clin. Chem., 1976; 22 : 1262-1268.
11. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976; 22 : 1982-1985.
12. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B. and Franzen, B., 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25 (4) : 629-638.
13. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. and Tyllia, M.M., 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

helena | BioSciences Europe

www.helena-biosciences.com

Helena Biosciences Europe
Queensway South
Team Valley Trading Estate
Gateshead
Tyne and Wear
NE11 0SD

tel: +44 (0) 191 482 8440
fax: +44 (0) 191 482 8442

email: info@helena-biosciences.com

