

SAS-MX Immunofix-Plus

Instructions For Use REF I00400

SAS-MX Immunofix-Plus
Fiche technique

SAS-MX Immunofix-Plus
Anleitung

SAS-MX Immunofix-Plus
Istruzioni per l'uso

SAS-MX Immunofix-Plus
Instrucciones de uso

Contents

English	1
Français	7
Deutsch	13
Italiano	19
Español	25



INTENDED PURPOSE

The SAS-MX IFE-Plus kit is intended for the separation and identification of monoclonal gammopathies by agarose gel electrophoresis with the Helena BioSciences SAS-MX electrophoresis chamber.

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.

Alfonso first described immunofixation in the literature in 1964¹. Alper and Johnson published a more practical procedure in 1969, and published a number of studies utilising this technique^{2,4}. Immunofixation has been used as a procedure for the investigation of immunoglobulins since 1976^{5,6}.

The SAS-MX IFE-Plus 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-MX IFE Gel (x10)**

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

2. Tris / Barbitol Buffer Concentrate (1x 100ml)

Contains concentrated Tris / Barbitol buffer with sodium azide as preservative. Dilute the contents of the bottle to 1 litre with purified water and mix well.

3. Acid Blue Stain Concentrate (1x 75ml)

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

4. Destain Solution Concentrate (1x 40ml)

Contains concentrated Destain Solution. Dilute the contents of the bottle to 2 litres with purified water. Store in a tightly stoppered bottle.

5. Other Kit Components

Each kit contains Instructions For Use and sufficient Sample Application Templates, Antisera Templates and Blotters A, B, C, D and X to complete 10 gels.

STORAGE AND SHELF-LIFE

1. SAS-MX 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. Tris / Barbitol Buffer

The buffer concentrate should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Diluted buffer is stable for 2 months at 15...30°C. Cloudiness or poor performance of the diluted buffer may indicate deterioration.

3. Acid Blue 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 of the stain solution.

4. 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. Cloudiness may indicate deterioration.

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Cat. No. 4063 SAS-MX Chamber

Cat. No. 1525 EPS600 Power Supply

Cat. No. 9400 IFE Control Kit

Cat. No. 4062 Incubation Chamber

Cat. No. 9035 Immuno SuperPress / Cat. No. 5014 Development Weight

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

Saline Solution (0.85% NaCl)

Purified water

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Freshly collected serum is the specimen of choice. Samples can be stored refrigerated at 2...6°C for up to 72 hours or 2 weeks at -20°C. Urine and CSF can also be used following a suitable concentration step :

Total Protein (mg/dL)	Conc. Factor
<50	100 x
50 - 100	50 x
100 - 300	25 x
300 - 600	10 x
600 - 1000	5 x

These concentrated CSF and urine samples should be used neat on the gel.

Serum samples should be diluted 1+1 in the SP Lane, and diluted 1+9 with saline solution for all 5 immunoglobulin lanes.

When typing minimono-clonal bands, the sample for the immunoglobulin lanes should be undiluted serum.

When typing high concentration monoclonal bands, the sample for the immunoglobulin lanes should be diluted more than 1 + 9 to prevent prozoning.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

1. Remove the gel from the packaging and place on a paper towel. Remove the overlay and blot the gel surface with a blotter C, discard blotter.
2. Align the sample application template with the arrows at the edge of the gel. Place a blotter A on top of the template and rub a finger across the slits to ensure good contact. Remove the blotter and retain for use in Step 5.
3. Apply 3 μ l of sample to each slit and allow to absorb for 5 minutes.
4. Whilst the samples are absorbing, pour 50ml of buffer into each inner section of the SAS-MX Chamber.
5. Following sample absorption, blot the template with the blotter A retained from Step 2 and remove both blotter and template.
6. Position the gel in the chamber agarose side up, aligning the positive (+) and negative (-) sides with the corresponding positions on the chamber.
7. Electrophorese the gel: 120 volts, 25 minutes.
8. Following electrophoresis, place the gel into the incubation chamber containing a wet blotter and position the antiserum application template onto the gel surface. **NOTE:** Ensure good contact of template and gel.
9. Apply 1 μ l of the appropriate IFE Control to the wells in the gel. Close the incubation chamber and allow to absorb completely (approximately 3 minutes).
10. Apply 2 drops of Protein Fixative to the SP lane and 2 drops of the appropriate antiserum into the immunoglobulin lanes. Ensure even distribution of antiserum in the lane (including the control wells) by rocking the gel.
11. Incubate the gel at 15...30°C for 10 minutes.
12. Following incubation, remove the antiserum template by washing the gel in saline solution briefly with gentle agitation.
13. Place the gel on a blotter D agarose side up. Place a blotter B (wetted in saline) onto the surface of the gel followed by a blotter X. Press the gel in an IFE SuperPress for 5 minutes or use a development weight for 10 minutes.
14. Remove the blotters and place the gel in saline solution for 4 minutes with gentle agitation.
15. Place the gel on a blotter D agarose side up. Place a blotter B (wetted in saline) onto the surface of the gel followed by a blotter D. Press the gel in an IFE Superpress for 1 minute or use a development weight for 3 minutes.
16. Remove the blotters and dry the gel at 60...70°C.
17. Immerse the dry gel in stain solution for 4 minutes.
18. Destain the gel in 2 x 2 minute washes of destain solution.
19. Wash the gel briefly in purified water and dry.

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.

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:

a) 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 precipitate 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 response^{7,8}. 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 b-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.

OPTIONAL EXTRA MATERIALS

Cat. No. 9249 Antiserum to Human IgD

Cat. No. 9250 Antiserum to Human IgE

Cat. No. 9412 Antiserum to Human Free Kappa Light Chain

Cat. No. 9413 Antiserum to Human Free Lambda Light Chain

BIBLIOGRAPHY

1. Afonso, E., 'Quantitation Immuno-electrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
2. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox Sang., 1969; 17 : 445-452.
3. 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.
4. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of α 1-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of PiM.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
5. 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.

6. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976; 22 : 1982-1985.
7. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B., and Franzén, B. 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25 (4) : 629-638.
8. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K., and Tyllia, M.M. 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

UTILISATION

Le kit SAS-MX IFE-Plus est utilisé pour la séparation et l'identification des gammopathies monoclonales par électrophorèse en gel d'agarose avec la chambre de migration Helena BioSciences SAS-MX.

L'immunofixation (IFE) est une procédure en deux étapes utilisant l'électrophorèse haute résolution en gel d'agarose dans un 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 plasmatique 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 la macroglobulinémie de Waldenström. Il faut faire une différence entre les gammopathies polyclonales et les gammopathies monoclonales car les gammopathies polyclonales correspondent au stade secondaire de certaines maladies en raison de troubles cliniques comme une maladie hépatique chronique, des altérations du collagène, une polyarthrite rhumatoïde et des infections chroniques.

Alfonso a été le premier à décrire l'immunofixation dans la littérature en 1964¹. Alper et Johnson ont publié une procédure plus simple en 1969, puis de nombreuses études utilisant cette technique^{2,4}. L'immunofixation est utilisée comme procédure pour l'étude des immunoglobulines depuis 1976^{3,6}.

Le kit SAS-MX IFE-Plus sépare les protéines sériques selon leur charge en gel d'agarose. Les protéines sont ensuite mises en contact avec un antiserum monospécifique, lavées et colorées pour permettre la visualisation de l'immunoprécipité en vue d'une interprétation qualitative.

PRÉCAUTIONS

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-MX IFE-Plus (x10)**

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

2. **Tampon concentré Tris / Barbital (1x 100ml)**

Contient un tampon Tris / Barbital concentré additionné d'azide de sodium comme conservateur. Diluer le contenu du flacon dans 1 litre d'eau distillée et bien mélanger.

3. **Colorant bleu acide concentré (1x 75ml)**

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

4. **Solution décolorante concentrée (1x 40ml)**

Contient la solution décolorante concentrée. Diluer le contenu du flacon dans 2 litres d'eau distillée. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

5. **Autres composants du kit**

Chaque kit contient également une fiche technique, des buvards A, B, C, D et X, des masques applicateur échantillons et antisérums pour 10 gels.

STOCKAGE ET CONSERVATION

1. Plaque SAS-MX IFE-Plus

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

2. Tampon Tris / Barbitol

Le tampon concentré doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Après reconstitution, le tampon est stable 2 mois entre 15...30°C. Un aspect floconneux ou une perte de performance indique une détérioration du tampon reconstitué.

3. Colorant bleu acide

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 jeter le colorant utilisé afin d'éviter que la capacité de coloration ne diminue. Si la performance de coloration diminue, cela indique une détérioration de la solution colorante.

4. Solution décolorante

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. Un aspect floconneux indique une détérioration de la solution décolorante.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 4063 Chambre de migration SAS-MX

Réf. 1525 Générateur EPS600

Réf. 9400 Kit de contrôle IFE

Réf. 4062 Chambre d'incubation

Réf. 9035 Immuno SuperPress / Réf. 5014 Poids à développement

Étuve de séchage à convection forcée offrant une température entre 60...70°C

Solution physiologique (0,85% NaCl)

Eau distillée

PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS

L'utilisation de sérums fraîchement prélevés est fortement recommandée. Les échantillons peuvent être conservés 72 heures entre 2...6°C ou 2 semaines à -20°C. Il est possible d'utiliser des échantillons d'urine ou de LCR après concentration:

Protéine totale (mg/dl)	Facteur de concentration
<50	100 x
50 - 100	50 x
100 - 300	25 x
300 - 600	10 x
600 - 1000	5 x

Les concentrats d'urine ou de LCR doivent être utilisés purs sur le gel.

Les échantillons doivent être dilués au 1+1 pour la case SP et dilué au 1+9 en solution physiologique pour les 5 autres cases.

Lors du typage de fines bandes monoclonales, l'échantillon doit être déposé pur dans toutes les cases. Lors du typage de bandes monoclonales dont la concentration est très élevée, pour les cases des immunoglobulines, la dilution de l'échantillon doit être supérieure au 1+9 afin d'éviter le phénomène de zone.

MÉTHODOLOGIE

1. Sortir le gel de son emballage et le déposer sur un papier absorbant. Retirer le film plastique, sécher la surface du gel à l'aide d'un buvard C, jeter le buvard.
2. Disposer le masque applicateur échantillon en faisant correspondre les flèches avec les 2 fentes latérales. Placer un buvard A sur le masque et passer délicatement le doigt sur les fentes afin d'assurer un contact optimal. Retirer le buvard A et le conserver pour l'étape 5.
3. Déposer 3 μ L d'échantillon sur chaque fente et laisser absorber 5 minutes.
4. Pendant ce temps, verser 50ml de tampon dans chaque compartiment intérieur de la chambre de migration.
5. Une fois l'absorption de l'échantillon terminée, sécher le masque applicateur avec le buvard A conservé à l'étape 2 puis enlever le buvard et le masque applicateur.
6. Placer le gel, agarose vers le haut, dans la chambre de migration, en respectant les polarités.
7. Faire migrer à 120 volts pendant 25 minutes.
8. Une fois l'électrophorèse terminée, déposer le gel sur un buvard humide dans la chambre d'incubation et positionner le masque applicateur antisérums sur le gel. **REMARQUE:** Assurer un contact optimal entre le masque et le gel.
9. Déposer 1 μ l du contrôle IFE approprié dans les puits du gel. Fermer la chambre d'incubation et attendre l'absorption complète (environ 3 minutes).
10. Déposer 2 gouttes de solution fixative dans la case SP et 2 gouttes de l'antisérum approprié dans les cases d'immunoglobuline. Assurer la parfaite répartition de l'antisérum dans la case (y compris dans les puits de contrôle) en inclinant le gel.
11. Incuber le gel entre 15...30°C pendant 10 minutes.
12. Une fois l'incubation terminée, retirer le masque applicateur par lavage rapide en solution saline sous agitation douce.
13. Placer le gel, agarose vers le haut, sur un buvard D. Déposer un buvard B (imbibé de solution physiologique) sur le gel puis par-dessus un buvard X. Presser à l'aide d'une IFE SuperPress pendant 5 minutes ou bien utiliser un poids à développement pendant 10 minutes.
14. Retirer les buvards et placer le gel dans un bain de solution physiologique sous agitation douce pendant 4 minutes.
15. Placer le gel, agarose vers le haut, sur un buvard D. Déposer un buvard B (imbibé de solution physiologique) sur le gel puis par-dessus un buvard D. Presser à l'aide d'une IFE SuperPress pendant 1 minute ou bien utiliser un poids à développement pendant 3 minutes.
16. Retirer les buvards et sécher le gel entre 60...70°C.
17. Plonger le gel sec dans le colorant pendant 4 minutes.
18. Décolorer le gel dans 2 bains successifs de 2 minutes de solution décolorante.
19. Rincer rapidement sous un jet d'eau distillée et sécher.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La plupart des protéines monoclonales migrent vers le côté cathodique (gamma) du protéinogramme, mais, en raison de leur caractère anormal, il est possible qu'elles migrent ailleurs dans la zone des globulines sur l'électrophorèse de protéines. La bande monoclonale sur le protéinogramme par immunofixation occupe la même place et a la même forme que la bande anormale sur le protéinogramme sérique. La protéine anormale est identifiée par le type d'antisérum avec lequel elle réagit.

Lorsqu'une faible concentration de protéine anormale est présente, il est possible que la bande anormale apparaisse dans la zone de l'immunoglobuline polyclonale normale. Il est aussi possible de détecter une bande dans un bruit de fond polyclonal lorsqu'une grande quantité d'immunoglobuline polyclonale est présente.

Le document 'Immunofixation for the Identification of Monoclonal Gammopathies' est disponible auprès d'Helena BioSciences sur simple demande.

LIMITES

1. Excès d'antigènes

On parle d'excès d'antigènes lorsqu'il n'y a ni un léger excès d'anticorps ni une équivalence antigènes / anticorps sur le lieu de précipitation. L'excès d'antigènes en IFE est en général dû à un excès d'immunoglobuline dans l'échantillon du patient. Il se caractérise par un phénomène de zone (zones non colorées dans le centre de la bande de la protéine immunoprécipitée, avec une coloration du contour). Il faut utiliser un échantillon plus dilué dans ce cas afin d'optimiser la concentration en immunoglobuline.

2. Précipitation non spécifique dans toutes les cases

Une IFE montre de temps en temps 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 du gel. 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 dans les autres cases, ce qui simplifie le diagnostic.

b) Taux élevé de facteur rhumatoïde ou d'immun-complexes

Des échantillons présentant un taux élevé de facteur rhumatoïde ou d'immun-complexes peuvent former un précipité au point de dépôt. Une réduction de l'échantillon avec du DTT ou du β -2-mercaptoéthanol peut éliminer cette réaction non spécifique (Mélanger 190 μ l de dilution d'échantillon avec 10 μ l de DTT à 1% en solution physiologique 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.

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

c) Fibrinogène

Si le fibrinogène est présent dans l'échantillon, il apparaîtra sous forme d'une très fine bande dans toutes les cases de l'IFE. Le fibrinogène est présent dans le plasma, mais il se trouve parfois dans le sérum de patients sous anticoagulants.

3. Réaction avec les chaînes légère kappa ou lambda, mais pas de réaction avec les antisérums à chaînes lourdes IgG, IgA ou IgM

Les échantillons présentant cette réaction peuvent avoir une chaîne libre légère monoclonale ou une IgD ou IgE monoclonale. Dans ce cas, il est nécessaire de recommencer l'IFE en substituant les antisérums IgD et IgE par deux autres à chaînes lourdes. L'absence de réaction avec les antisérums IgD et IgE indique en principe l'existence d'une maladie des chaînes légères libres.

4. Bande dans la zone gamma, pas de réaction avec les antisérums de l'IFE

Il est possible que la protéine C-réactive (CRP) soit détectée chez les patients présentant une réaction inflammatoire aiguë^{7,8}. La CRP est mise en évidence sous la forme d'une bande mince sur l'extrémité du côté cathodique du protéinogramme sérique. Un niveau élevé d'alpha-1-antitrypsine et d'haptoglobine corrobore la présence de CRP. Les patients ayant une bande CRP présenteront probablement un dosage élevé de protéine C-réactive. 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 des échantillons congelés.

5. Absence de réaction avec les antisérums kappa et lambda

De temps en temps, un échantillon réagit avec un antisérum à chaîne lourde mais vous ne détectez aucune réaction avec les chaînes légères. Dans ce cas, vous devez éliminer les hypothèses suivantes: a) une maladie des chaînes lourdes, b) une concentration très élevée en chaînes légères (ce qui entraîne un excès d'antigènes), c) une faible concentration en chaînes légères, d) une molécule à chaîne légère atypique ne réagissant pas avec l'antisérum, e) des chaînes légères avec des déterminants antigéniques « cachés » (comme cela existe parfois avec l'IgA et l'IgD). Pour obtenir des résultats définitifs, vous pouvez a) réaliser une dilution plus grande ou plus petite de l'échantillon pour obtenir une meilleure équivalence anticorps / antigènes, b) utilisez des antisérums de plusieurs fabricants afin de vous aider à identifier les immunoglobulines atypiques et c) traiter l'échantillon avec du B-2-mercaptoéthanol afin de « révéler » les chaînes libres.

PERFORMANCES

Différents échantillons ont été réalisés et comparés avec un autre kit du commerce. Les résultats obtenus sur ces deux kits sont équivalents.

RÉACTIFS OPTIONNELS

Réf. 9249 Antisérum anti IgD humaine

Réf. 9250 Antisérum anti IgE humaine

Réf. 9412 Antisérum anti chaîne légère libre kappa humaine

Réf. 9413 Antisérum anti chaîne légère libre lambda humaine

BIBLIOGRAPHIE

1. Alfonso, E., 'Quantitation Immuno-electrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964 ; 10 : 114-122.
2. Alper, C.A et Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox Sang., 1969 ; 17 : 445-452.
3. 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.
4. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of α 1-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of PiM.', J. Lab. Clin. Med., 1976 ; 87 : 152-163.

5. Cawley, L.P., Minard, B.J., Tourtellotte, W.W., Ma, B.I. et Chelle, C. 'Immunofixation Electrophoretic Technique Applied to Identification of Proteins in Serum and Cerebrospinal Fluid', Clin. Chem., 1976 ; 22 : 1262-1268.
6. Ritchie, R.F et Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976 ; 22 : 1982-1985.
7. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B., et Franzén, B. 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979 ; 25 (4) : 629-638.
8. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K., et Tyllia, M.M. 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980 ; jan/fév : 3-15.

ANWENDUNGSBEREICH

Der SAS-MX IFE-Plus Kit dient zur Auftrennung und Identifizierung von monoklonalen Gammopathien durch Agarose-Gel-Elektrophorese in der Helena BioSciences SAS-MX Kammer.

Die Immunfixationselektrophorese (IFE) läuft in zwei Phasen ab. Die erste Phase besteht aus einer Agarose-Elektrophorese in hoher Auflösung, gefolgt von der Immunpräzipitation in der zweiten Phase. Der größte Bedarf für eine 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 Plasmazellklon vermehrt erhöhte Mengen von Immunglobulin einer einzelnen Klasse und eines einzelnen Typs 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 multiples 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.

1964 beschrieb Alfonso zum ersten Mal die Immunfixation in der Literatur¹. Alper und Johnson veröffentlichten 1969 eine etwas praktischere Vorgehensweise und veröffentlichten auch eine Anzahl von Studien, in denen diese Technik angewendet wurde^{2,4}. Die Immunfixation wird als Methode seit 1976 zur Untersuchung von Immunglobulinen verwendet^{5,6}.

Mit dem SAS-MX IFE-Plus Kit werden Serumproteine entsprechend ihrer Ladung im Agarose-Gel aufgetrennt. Die Proteine werden dann mit monospezifischen Antisera inkubiert, gewaschen und gefärbt, um das Immunpräzipitat zur qualitativen Auswertung sichtbar zu machen.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

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

INHALT**1. SAS-MX IFE-Gel (x10)**

Enthält Agarose in einem Tris-Barbital-Aspartat-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.

2. Tris-Barbital-Pufferkonzentrat (1x 100ml)

Enthält konzentrierten Tris-Barbital-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Den Inhalt der Flasche mit dest. Wasser auf 1 Liter verdünnen. Gut schütteln.

3. „Saures-Blau“ Farbstoffkonzentrat (1x 75ml)

Enthält konzentrierte „Saures-Blau“ Farbstofflösung. Den Inhalt der Flasche auf 700ml mit dest. Wasser verdünnen. Über Nacht rühren und vor dem Gebrauch filtrieren. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

4. Entfärbelösung-Konzentrat (1x 40ml)

Enthält konzentrierte Entfärbelösung. Den Inhalt der Flasche auf 2 Liter mit dest. Wasser verdünnen. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

5. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält ausreichende Probenauftragsschablonen, Antiserenschablonen und Blotter A, B, C, D und X für 10 Gele.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. SAS-MX IFE-Gel

Gele sollten bei 15...30°C gelagert werden und sind bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. NICHT IM KÜHLSCHRANK ODER TIEFKÜHLSCHRANK AUFBEWAHREN! Der Zustand des Gels kann sich verschlechtern. Dafür gibt es folgende Merkmale: 1) Kristallisation weist auf vorangegangenes Einfrieren hin, 2) Risse und Ablösen weisen auf ein Austrocknen des Gels hin, und 3) sichtbare Kontamination der Agarose durch Bakterien oder Pilze.

2. Tris-Barbital-Puffer

Das Pufferkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Pufferlösung ist bei einer Temperatur von 15...30°C für 2 Monate stabil. Trübung oder schlechte Ergebnisse des verdünnten Puffers können auf einen Verfall hinweisen.

3. „Satures-Blau“ Farbstoff

Das Farbstoffkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Die verdünnte Farbstofflösung ist bei einer Temperatur von 15...30°C für 6 Monate stabil. Es wird empfohlen, benutzten Farbstoff sofort zu entsorgen, um eine Minderung der Färbeleistung zu verhindern. Eine schlechte Färbeleistung kann auf eine Verschlechterung der Färbelösung hinweisen.

4. Entfärbelösung

Das Entfärberkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Verdünnte Entfärbelösung ist bei einer Temperatur von 15...30°C für 6 Monate stabil. Trübung kann auf den Verfall hinweisen.

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 4063 SAS-MX Kammer

Kat. Nr. 1525 EPS600 Netzteil

Kat. Nr. 9400 IFE Kontroll-Kit

Kat. Nr. 4062 Inkubationskammer

Kat. Nr. 9035 Immun-Super-Presser oder Kat. Nr. 5014 Entwicklungsgewicht

Trockenschrank mit Umluft und einer Temperaturleistung von 60...70°C

Kochsalzlösung (0,85% NaCl)

Dest. Wasser

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Frisch entnommenes Serum ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Proben können bis zu 72 Stunden bei 2...6°C oder 2 Wochen bei -20°C gelagert werden. Urin und Liquorproben können nach einem angemessenen Konzentrierungsschritt ebenfalls verwendet werden:

Protein, gesamt (mg/dL)	Konzentrierungsfaktor
<50	100-fach
50 -100	50-fach
100 -300	25-fach
300 -600	10-fach
600 -1000	5-fach

Diese konzentrierten Liquor- und Urinproben sollten auf dem Gel unverdünnt verwendet werden.

Serum vor Gebrauch mit physiologischer Kochsalzlösung (0,85%) im Verhältnis 1:2 (1+1) für die Kontrollspur (SP) und 1:10 (1+9) für die Spuren der Immundefixation (G, A, M, K, L) verdünnen.

Bei der Typisierung von mini-monoklonalen Banden sollte die Probe für die Immunglobulinspuren unverdünntes Serum sein.

Bei der Typisierung von monoklonalen Banden in hoher Konzentration sollte die Probe für die Immunglobulinspuren über 1+9 verdünnt werden, um ein Prozonophänomen zu verhindern.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

1. Das Gel aus der Verpackung nehmen und auf ein Papiertuch legen. Die Schutzfolie entfernen und das Gel mit Blotter C blotten. Blotter werfen.
2. Die Auftragschablone so auf das Gel legen, dass die Pfeile am Rand des Gels liegen. Blotter A auf die Schablone legen und mit einem Finger über die Schlitze der Schablone streichen, um eine gute Haftung zu gewährleisten. Blotter A entfernen und ihn bis zur Verwendung in Schritt 5 beiseite legen.
3. 3µl der Probe in jeden Schablonenschlitz pipettieren. Die Probe 5 Minuten ins Gel diffundieren lassen.
4. Während die Probe einwirkt, 50ml Puffer in jeden der inneren Bereiche der SAS-MX-Kammer füllen.
5. Nach Absorption der Probe den Blotter A aus Schritt 2 auf die Schablone drücken. Anschließend Schablone und Blotter entfernen.
6. Das Gel, Agaroseseite nach oben, in die Kammer spannen und auf übereinstimmende Polarisierung achten (Pluszeichen auf dem Gel und Pluszeichen in der Kammer).
7. Gel-Elektrophorese durchführen: 120 Volt, 25 Minuten.
8. Nach der Elektrophorese das Gel in die Inkubationskammer legen, die mit einem feuchten Blotter ausgelegt ist, und die Schablone zum Auftragen des Antiserums auf die Geloberfläche positioniert. Bitte beachten: Einen guten Kontakt zwischen Schablone und Gel herstellen.
9. 1µl der entsprechenden IFE-Kontrolle in die Vertiefungen des Gels pipettieren. Die Inkubationskammer schließen und für eine vollständige Absorption etwa drei Minuten warten.
10. Zwei Tropfen Proteinfixierung in die SP-Spur pipettieren und 2 Tropfen des entsprechenden Antiserums in die Immunglobulinspuren. Das Antiserum in der Spur (einschließlich Kontrollspur) durch wiederholtes Neigen des Gels gleichmäßig verteilen.
11. Gel für 10 Minuten bei 15...30°C inkubieren.

12. Nach der Inkubation die Schablone für das Antiserum durch kurzes Abspülen des Gels mit Kochsalzlösung bei sanfter Bewegung entfernen.
13. Das Gel mit der Agaroseseite nach oben auf einen Blotter D legen. Einen mit Kochsalz angefeuchteten Blotter B, gefolgt von einem Blotter X auf die Geloberfläche legen. Das Gel für 5 Minuten in einer IFE Superpresse pressen oder 10 Minuten lang ein Entwicklungsgewicht auflegen.
14. Die Blotter entfernen und das Gel 4 Minuten unter sanfter Bewegung in Kochsalzlösung waschen.
15. Das Gel mit der Agaroseseite nach oben auf einen Blotter D legen. Einen mit Kochsalz angefeuchteten Blotter B gefolgt von einem Blotter D auf die Geloberfläche legen. Das Gel für 1 Minuten in einer IFE Superpresse pressen oder 3 Minuten lang ein Entwicklungsgewicht auflegen.
16. Die Blotter entfernen und das Gel bei 60...70°C trocknen.
17. Das trockene Gel 4 Minuten in der Färbelösung färben.
18. Das Gel in zwei jeweils 2 Minuten dauernden Waschvorgängen mit Entfärbelösung entfärben.
19. Gel kurz mit dest. Wasser abspülen und trocknen.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die Mehrzahl der monoklonalen Proteinen wandern in den katodischen Gammabereich des Proteinmusters, können aber aufgrund ihrer pathologischen Beschaffenheit bei der Protein-Elektrophorese überall innerhalb des Globulinbereichs hin wandern. Die monoklonale Proteinbande auf dem Muster der Immunfixation belegt dieselbe Position und Form wie die pathologische Bande auf dem Serumproteinmuster. Das pathologische Protein wird durch Reaktion mit dem ihm entsprechenden Antiserum identifiziert.

Sind niedrige Konzentrationen pathologischen Proteins vorhanden, kann diese pathologische Bande innerhalb des normalen polyklonalen Immunglobulins auftreten. Auch bei großer polyklonaler Immunglobulinpräsenz kann eine Bande auch innerhalb eines polyklonalen Hintergrunds erkannt werden. Die Veröffentlichung „Immunofixation for the Identification of Monoclonal Gammopathies“ (Immunfixation zur Identifizierung monoklonaler Gammopathien) kann auf Anfrage über Helena BioSciences bezogen werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Antigenüberschuss

Antigenüberschuss tritt auf, wenn am Präzitationsort kein leichter Antikörperüberschuss oder Antigen-/Antikörperäquivalenz vorhanden ist. Antigenüberschuss bei der IFE liegt gewöhnlicherweise an einem Überschuss an Immunglobulin in der Patientenprobe. Antigenüberschuss wird durch Prozonophänomen (ungefärbte Bereiche in der Mitte der immunfixierten Proteinbande mit einer Färbung im Kantebereich) charakterisiert. In diesem Fall sollte zur Optimierung der Immunglobulin-Konzentration die Probe höher verdünnt werden.

2. Unspezifische Präzitation in allen Immunglobulinspuren

Gelegentlich zeigt eine fertige IFE-Platte über die Platte verteilt eine Präzipitatbande an der gleichen Stelle in jedem Muster. 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 Antiserumspuren des Gels. Wo die Bande allerdings mit einem spezifischen Antiserum für schwere und leichte Ketten reagiert, vergrößert sich die Bande und ihre Färbeintensität, wodurch der Immunglobulintyp erkennbar wird. Die Diagnose wird weiterhin vereinfacht, indem man die Probe weiter verdünnt, wodurch die Unterscheidung zwischen der IgM Antikörperreaktion und der unspezifischen Färbung des ausgefallenen IgM-Proteins in den anderen Spuren verbessert wird.

b) Hoher Rheumafaktor-Titer oder Immunkomplexe

Proben mit hohen Rheumafaktor-Titern oder anderen Immunkomplexen können am Probenauftragsort eine Präzipitationsbande anzeigen. Reduktion der Probe mit DTT oder β -2-Mercaptoethanol kann diese unspezifische Reaktion verhindern. (190 μ L Serum mit 10 μ L DTT 1% in einer 0,85% Kochsalzlösung vermischen, oder 100 μ L Serum mit 10 μ L einer 1:10 verdünntem Lösung β -2-Mercaptoethanol in Wasser mischen). IFE wie gewohnt durchführen. Bitte beachten: Beim Umgang mit β -2-Mercaptoethanol immer unter dem Abzug arbeiten.

c) Fibrinogen

Wenn sich Fibrinogen in der Probe befindet, zeigt sich das als schwache Bande in allen Reihen des Immunfixationsmusters. Fibrinogen ist im Plasma vorhanden und gelegentlich im Serum von Patienten, die mit Antikoagulanzen therapiert werden.

3. Reaktion mit Kappa- oder Lambda-Leichtketten-Antisera, aber keine Reaktion mit IgG-, IgA- oder IgM-Schwerketten-Antisera

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

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

C-reaktives Protein (CRP) kann bei Patienten mit akuter entzündlicher Reaktion nachgewiesen werden^{7,8}. CRP erscheint als schmale Bande an der Katodenseite des Serum-Proteinmusters. Erhöhtes Alpha-Antitrypsin und Haptoglobin bestärkt die Anwesenheit von CRP. Bei Patienten mit einer CRP-Bande lassen sich wahrscheinlich auch erhöhte CRP-Werte feststellen. Manchmal sieht man eine schmale Bande am Punkt des Probenauftrags. Dieser kann durch Chylomikronen im Serum oder aber durch ausgefallenes Eiweiß in Proben, die eingefroren waren, verursacht werden.

5. Keine Reaktivität mit Kappa- und Lambda-Antiserum

Gelegentlich reagiert eine Probe mit einem Schwerketten-Antiserum, ohne dass eine Reaktion mit einem Leichtketten-Antiserum ersichtlich ist. In diesem Fall muss Folgendes ausgeschlossen werden – a) Schwerkettenkrankheit, b) sehr hohe Leichtkettenkonzentrationen, die zu Antigenüberschuss führen, c) niedrige Konzentrationen von Leichtketten, d) atypische, nicht mit dem Antiserum reagierende Leichtketten-Moleküle, e) Leichtketten mit „versteckten“ Leichtkettendeterminanten (wird manchmal bei IgA und IgD beobachtet). Zum Erhalt endgültiger Ergebnisse kann Folgendes getestet werden: a) höhere oder niedrigere Probenverdünnung zur Optimierung der Antikörper-/Antigenäquivalenz, b) Antisera verschiedener Hersteller, um die Identifizierung atypischer Immunglobuline zu unterstützen und c) Behandlung der Probe mit Mercaptoethanol, um die Leichtketten zu „enthüllen“.

LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

Mit dieser Methode und einem anderen kommerziell erhältlichen Testkit wurden eine Anzahl Proben analysiert und die erhaltenen Messwerte verglichen. Beide Methoden liefern übereinstimmende Resultate.

OPTIONAL ERHÄLTICHE ANTISEREN

Kat. Nr. 9249 Antihumanserum IgD

Kat. Nr. 9250 Antihumanserum IgE

Kat. Nr. 9412 Antihumanserum freie kappa-light-Kette

Kat. Nr. 9413 Antihumanserum freie lambda-light-Kette

LITERATUR

1. Alfonso, E., 'Quantitation Immuno-electrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
2. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox Sang., 1969; 17 : 445-452
3. 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.
4. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of Alpha(1)-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of PiM.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
5. 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.
6. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976; 22 : 1982-1985.
7. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B., and Franzén, B. 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25(4) : 629-638.
8. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. and Tyllia, M.M. 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

PRINCIPIO

Il kit SAS-MX Immunofix-Plus è stato formulato per la separazione ed identificazione delle gammopatie monoclonali mediante elettroforesi proteica su gel di agarosio, eseguita con camera elettroforetica Helena BioSciences.

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.

Il primo a descrivere l'immunofissazione in letteratura nel 1964¹ fu Alfonso. Alper e Johnson pubblicarono una procedura più pratica nel 1969, oltre ad una serie di studi in cui veniva utilizzata questa tecnica^{2,4}. A partire dal 1976, l'immunofissazione è stata usata come procedura per lo studio delle immunoglobuline^{3,6}.

Il kit SAS-MX IFE-Plus separa le proteine del siero secondo la loro carica elettrica in un gel di agarosio. Le proteine vengono poi incubate con antisieri monospecifici, lavate e colorate in modo da permettere la visualizzazione dell'immunoprecipitato per l'interpretazione qualitativa.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutti i reagenti devono essere utilizzati esclusivamente per diagnosi in vitro. Non ingerire né pipettare con la bocca i componenti del kit. Indossare guanti protettivi durante l'uso dei componenti del kit. Riferirsi alle schede tecniche e dati di sicurezza per le avvertenze sui componenti dei Kit.

COMPOSIZIONE

1. Piastre SAS-MX IFE-Plus (x10)

Contiene agarosio in tampone Tris barbital / aspartato con sodio azide come conservante. Il gel è pronto all'uso nella confezione fornita.

2. Tampone concentrato Tris / barbital (1x 100ml)

Ogni bottiglia contiene tampone concentrato Tris / barbital con sodio azide 0.1% aggiunto come conservante. Diluire l'intero contenuto del flacone con 1 litro di acqua distillata e miscelare bene.

3. Colorante concentrato Acido Blu (1x 75ml)

Contiene colorante concentrato Acido Blu. Diluire l'intero contenuto del flacone con 700ml di acqua distillata. Agitare "overnight" e filtrare prima dell'uso. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

4. Soluzione decolorante concentrata (1x 40ml)

Contiene soluzione decolorante concentrata. Diluire l'intero flacone in 2L di acqua distillata. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

5. Altri componenti del kit

Ciascun kit contiene un numero sufficiente di mascherine per l'applicazione dei campioni, mascherine per l'applicazione degli antisieri, carta bibula di tipo A, B, C, D e X per 10 gel.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

1. Piastre SAS-MX IFE-Plus

Il gel deve essere conservato a 15...30°C, ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sulla confezione. **NON REFRIGERARE NÉ CONGELARE.** Il deterioramento del gel può essere indicato da 1) formazioni cristalline per effetto di congelamento, 2) screpolature e fessurazione per effetto di essiccamento oppure 3) contaminazione visibile dell'agarosio causata da batteri o funghi.

2. Tampone tris-barbital

Il tampone concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone. Il tampone diluito è stabile per 2 mesi a 15...30°C. La torbidità o le scarse prestazioni del tampone diluito possono indicare un suo deterioramento.

3. Colorante Acido Blu

Il colorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone. La soluzione colorante diluita è stabile per 6 mesi a 15...30°C. Si raccomanda di gettare immediatamente il colorante utilizzato per evitare la riduzione della capacità di colorazione. Risultati insoddisfacenti della colorazione possono indicare un deterioramento della soluzione colorante.

4. Soluzione Decolorante

La soluzione decolorante concentrata deve essere conservata a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sulla bottiglia. La soluzione decolorante diluita è stabile per 6 mesi a 15...30°C. La presenza di torbidità può indicare il suo deterioramento.

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

Cod. 4063 Camera SAS-MX

Cod. 1525 Alimentatore EPS600

Cod. 9400 Kit di controllo IFE

Cod. 4062 Camera di incubazione

Cod. 9035 Immuno SuperPress / Cod. 5014 Peso di sviluppo

Forno di essiccazione ad aria forzata con temperature di 60...70°C

Soluzione fisiologica (0,85% NaCl)

Acqua distillata

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Si consiglia di utilizzare siero, urine, liquido cerebrospinale freschi. I campioni possono essere conservati in frigorifero fino a 72 ore a 2...6°C o 2 settimane a -20°C. Si possono utilizzare campioni di urine e CSF previa opportuna concentrazione:

Proteina totale (mg/dL)	Conc. Fattore
<50	100 x
50 - 100	50 x
100 - 300	25 x
300 - 600	10 x
600 - 1000	5 x

Questi campioni di urina e LCS concentrati devono essere utilizzati puri sul gel.

I campioni di siero devono essere diluiti con soluzione fisiologica: 1 + 1 per il tracciato di riferimento SP 1 + 9 per tutte 5 le immunoglobuline

Nella tipizzazione delle bande minimonoclonali, utilizzare come campione per le finestre di immunoglobuline siero non diluito. Nella tipizzazione delle bande monoclonali ad elevata concentrazione, il campione per le finestre di immunoglobuline deve essere diluito oltre 1 + 9 per evitare l'effetto prozona.

PROCEDURA

1. Rimuovere il gel dalla confezione e collocarlo su una bibula. Asciugare la superficie del gel con un blotter "C" e poi scartarlo.
2. Applicare la mascherina di semina allineandola con i punti laterali del gel. Porre un blotter A sopra alla mascherina ed effettuare una leggera pressione con le dita sulle fessure per verificare il corretto contatto. Rimuovere il blotter e conservarlo per il passaggio 5.
3. Applicare 3 μ l di campione in ogni fessura di semina e lasciare assorbire per 5 minuti.
4. Durante l'assorbimento, collocare 50ml di tampone in ogni compartimento interno della camera di migrazione.
5. Dopo l'assorbimento del campione, collocare sopra alla mascherina il blotter A per asciugare l'eventuale eccesso di campione non assorbito. Eliminare il blotter e la maschera per l'applicazione del campione.
6. Collocare la piastra all'interno della camera con il gel verso l'alto e allineando il lato positivo + e negativo - corrispondenti alle posizioni della camera.
7. Sottoporre il gel ad elettroforesi a 120 volt per 25 minuti.
8. Applicare la mascherina per gli antisieri sulla piastra di gel, facendola combaciare con le finestre prestampate sulla piastra. Nota: Verificare il corretto contatto fra la mascherina ed il gel.
9. Applicare 1 μ l dell'opportuno controllo IFE nei pozzetti presenti sul gel. Chiudere la camera e lasciare assorbire completamente (circa 3 minuti).
10. Applicare 2 gocce di Fissante proteico nella finestra SP e 2 gocce degli antisieri specifici, in ognuna delle relative finestre già contrassegnate. Erogare le gocce tenendo il flaconcino verticalmente, quindi assicurare un contatto ottimale dell'antisiero per tutta la finestra facendo ruotare opportunamente il gel.
11. Lasciare il gel in incubazione a 15...30°C per 10 minuti.
12. Al termine dell'incubazione rimuovere la mascherina degli antisieri, e lavare il gel brevemente in fisiologica per rimuovere l'eccesso di antisiero.
13. Collocare il gel su un blotter D con l'agarosio verso l'alto. Collocare un blotter B (inumidito in soluzione fisiologica) sulla superficie del gel, seguito immediatamente da un blotter X. Comprimerne il gel in una SuperPress IFE per 5 minuti, oppure utilizzare un peso di sviluppo per 10 minuti.
14. Rimuovere i blotter e mettere il gel nella soluzione fisiologica per 4 minuti agitando delicatamente.
15. Collocare il gel su un blotter D con l'agarosio verso l'alto. Collocare un blotter B (inumidito in soluzione fisiologica) sulla superficie del gel, seguito immediatamente da un blotter D. Comprimerne il gel in una SuperPress IFE per 1 minuto, oppure utilizzare un peso di sviluppo per 3 minuti.
16. Togliere i blotter ed asciugare il gel a 60...70°C.
17. Immergere il gel asciutto nella soluzione colorante per 4 minuti.
18. Decolorare il gel in due bagni di soluzione decolorante per 2 minuti ciascuno.
19. Sciacquare velocemente il gel con acqua e asciugare.

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. In presenza di una grande quantità di immunoglobulina policlonale, è inoltre possibile che compaia una banda all'interno di uno sfondo policlonale.

La pubblicazione "IMMUNOFIXATION FOR THE IDENTIFICATION OF MONOCLONAL GAMMOPATHIES"^{III} è disponibile dal Helena BioSciences, su richiesta.

LIMITI

1. Eccesso di antigene

Si verifica un eccesso di antigene se non si manifesta un lieve eccesso di anticorpo o l'equivalenza antigene / anticorpo nel punto della precipitazione. L'eccesso di antigene nell'IFE è normalmente dovuto a un eccesso di immunoglobulina nel campione del paziente. Tale eccesso di antigene è caratterizzato dalla pro-zona (aree non colorate al centro della banda proteica immunofissata, con colorazione attorno ai bordi). In questo caso è opportuno utilizzare una diluizione più alta del campione al fine di ottimizzare la concentrazione di immunoglobulina.

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) Immunoglobuline IgM monoclonali

Le proteine IgM monoclonali possono aderire alla matrice di gel. Comparirà una banda in tutte e 5 le linee di antisiero del gel. 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. Eseguire l'IFE come di consueto.

NOTA: In caso di utilizzo di β -2-mercaptoetanolo, operare sempre sotto una cappa chimica.

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

La proteina C reattiva (CRP) può essere rilevata in pazienti che presentano una risposta infiammatoria acuta^{7,8}. La CRP si presenta come una sottile banda all'estremità catodica del tracciato sieroproteico. Un'elevata alfa-1-antitripsina e aptoglobina sono la prova a sostegno della CRP. I pazienti con una banda CRP avranno probabilmente un livello elevato quando verranno sottoposti ad analisi per la CRP. Nel punto di applicazione del campione può talvolta comparire una sottile banda, che può essere causata dai chilomicroni nel siero o dalla proteina precipitata nei campioni congelati per la conservazione.

5. Non reattività con gli antisieri kappa e lambda

Talvolta un campione potrà avere una reazione con un antisiero a catena pesante ma non è ovvia nessuna reazione a catena leggera. In una situazione di questo tipo, è necessario escludere le seguenti possibilità - a) Malattia delle catene pesanti, b) Concentrazioni molto elevate di catene leggere, che determinano un eccesso di antigene, c) Basse concentrazioni di catene leggere, d) Molecola a catena leggera atipica che non reagisce con l'antisiero, e) catene leggere che presentano determinanti delle catene leggere 'nascoste' (come osservato talvolta con la 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 b-2-mercaptoetanolo per 'rilevare' le catene leggere.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

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

MATERIALE OPZIONALE

Cod. 9249 Antisiero IgD

Cod. 9250 Antisiero IgE

Cod. 9412 Antisiero catene leggere Kappa libere

Cod. 9413 Antisiero catene leggere Lamda libere

BIBLIOGRAFIA:

1. Alfonso, E., 'Quantitation Immunoelectrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
2. Alper, C.A. and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox Sang., 1969; 17 : 445-452.
3. 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.
4. Johnson, A.M., Johnson, A.M., 'Genetic Typing of α 1-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of PiM.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
5. 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.
6. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976; 22 : 1982-1985.
7. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B. and Franzén, B. 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25 (4) : 629-638.

8. Killingsworth, L.M. Cooney, S.K., and Tyllia, M.M. 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

USO PREVISTO

El kit IFE-Plus SAS-MX separa e identifica gammopatías monoclonales por electroforesis en gel de agarosa con la cámara de electroforesis SAS-MX de Helena Biosciences.

La electroforesis por inmunofijación (IFE) es un proceso de dos fases en el que, en la primera de ellas, se utiliza electroforesis con agarosa de alta resolución e inmunoprecipitación en la segunda fase.

La mayor demanda de IFE proviene de los laboratorios clínicos, donde se utiliza principalmente en la detección de gammopatías monoclonales. La gammopatía monoclonal es una enfermedad primaria en la que un único clon de célula plasmática produce elevados niveles de inmunoglobulina de una sola clase y tipo. Estas inmunoglobulinas se conocen como proteínas monoclonales, M-proteínas o paraproteínas. Su presencia puede ser o bien benigna o de importancia indeterminada. En algunos casos, éstas son indicativas de malignidad, como el mieloma múltiple o la macroglobulinemia. Es preciso distinguir entre gammopatías policlonales y gammopatías monoclonales, pues las gammopatías policlonales son enfermedades secundarias debidas a trastornos clínicos como la afección crónica del hígado, los trastornos de colágeno, artritis reumatoide e infección crónica.

Alfonso fue el primero en describir la inmunofijación en la literatura de 1964¹. Alper y Johnson publicaron un procedimiento más práctico en 1969, así como una serie de estudios en los que se utilizó esta técnica^{2,4}. La inmunofijación se ha utilizado como un proceso para la investigación de las inmunoglobulinas desde 1976^{5,6}.

El kit IFE-Plus SAS-MX separa las seroproteínas de acuerdo con la carga en un gel de agarosa. Después de esto las proteínas se incuban con antisueros monoespecíficos, se lavan y colorean para que se pueda observar la inmunoprecipitación y posteriormente realizar la interpretación cualitativa.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Todos los reactivos son exclusivamente para uso diagnóstico in-vitro. No ingerir ni chupar con la boca ningún componente del kit. Usar guantes para manejar todos los componentes del kit. Consultar la hoja con los datos de seguridad del producto acerca de los riesgos de los componentes, avisos de seguridad y consejos para su eliminación.

COMPOSICIÓN

1. Gel IFE SAS-MX (x10)

Contiene agarosa en un tampón Tris / Barbital / Aspartato, con azida de sodio como conservante. El gel viene envasado listo para usar.

2. Concentrado tampón de Tris-Barbital. (1x 100ml)

Contiene concentrado tampón de Tris / Barbital con azida de sodio como conservante. Diluir el contenido del frasco en un litro de agua purificada y mezclar bien.

3. Colorante azul ácido concentrado (1x 75ml)

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

4. Concentrado de solución decolorante (1x 40ml)

Contiene solución decolorante concentrada. Diluir el contenido del frasco en 2 litros de agua purificada. Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

5. Otros componentes del kit

Cada kit contiene una hoja de instrucciones y suficientes plantillas de aplicación de la muestra, plantillas antisuero y secante A, B y C hasta completar 10 geles.

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ

1. GEL IFE SAS-MX

Los geles han de almacenarse a temperatura entre 15...30°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad que indicada en el envase. NO REFRIGERAR NI CONGELAR. El deterioro del gel puede ser indicado por: 1) apariencia cristalina, indicativo de que el gel ha sido congelado, 2) agrietamiento y descamación, indicativo del resecamiento del gel, o 3) contaminación visible de la agarosa por fuentes bacterianas o micóticas.

2. Tampón de Tris-Barbital.

El concentrado tampón debe almacenarse a una temperatura entre 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. El concentrado tampón diluido es estable durante 2 meses a una temperatura entre 15...30°C. La turbiedad o un mal comportamiento del tampón diluido pueden ser indicios de deterioro.

3. Colorante azul 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 del frasco. La solución colorante preparada es estable durante 6 meses a una temperatura entre 15...30°C. Es aconsejable desechar inmediatamente el colorante usado para evitar el agotamiento de su capacidad de coloración. Unos malos resultados de coloración pueden ser indicio de deterioro de la solución colorante.

4. Solución decolorante

El concentrado decolorante debe guardarse a una temperatura entre 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. La solución decolorante diluida permanece estable durante 6 meses a una temperatura entre 15...30°C. La turbiedad puede ser indicativo de deterioro.

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

no de catálogo 4063 Cámara SAS-MX

no de catálogo 1525 Fuente de alimentación EPS600

no de catálogo 9400 Kit de Control IFE

no de catálogo 4062 Cámara de Incubación

no.de catálogo 9035 Immuno SuperPress / no de catálogo. 5014 Desarrollo de peso

Horno de secado de ventilación forzada con capacidad de 60...70°C

Solución Salina (0,85% NaCl)

Agua purificada

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La muestra elegida es suero recién recogido. Las muestras pueden guardarse refrigeradas a una temperatura entre 2...6°C hasta 72 horas o 2 semanas a -20°C. La orina y LCR también pueden usarse tras una fase de concentración adecuada.

Proteína Total (mg/dL)	Factor de concentración
<50	100 x
50 -100	50 x
100 -300	25 x
300 -600	10 x
600 -1000	5 x

Estos LCR concentrados y muestras de orina deben usarse, sin diluir, en el gel.

Las muestras de suero deben diluirse 1+1 en la banda SP, así como diluirse 1+9 en solución salina con las 5 bandas de inmunoglobulinas.

Al escribir las bandas minimonoclonales, debe escogerse suero no diluido como muestras para la vía de inmunoglobulina.

Al escribir las bandas monoclonales de alta concentración, deberán diluirse las muestras para las vías de inmunoglobulinas más de 1+9 para evitar el fenómeno de prozona.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

1. Sacar el gel del envase y colocarlo sobre una toallita de papel. Retirar el revestimiento, secar la superficie del gel con secante C, desechar el secante.
2. Alinear la plantilla de aplicación de la muestra con las flechas existentes en el borde del gel. Aplicar un secante A sobre la parte superior de la plantilla y frotar con un dedo a lo largo de las rejillas para asegurar un buen contacto. Retirar el secante A y conservarlo para utilizarlo luego en el paso 5.
3. Aplicar 2µl de muestra en cada ranura y dejar que absorba durante 5 minutos.
4. Mientras la muestra es absorbida, verter aproximadamente 50ml del concentrado tampón en cada hueco de la cámara SAS-MX.
5. Finalizada la absorción de la muestra, secar la plantilla con el secante A que se ha conservado del paso 2, retirar el secante y la plantilla.
6. Colocar el gel en la cámara con la agarosa hacia arriba, alineando los lados positivo (+) y negativo (-) con las posiciones correspondientes en la cámara.
7. Electroforesis del gel: 120 voltios, 25 minutos.
8. Finalizada la electroforesis, poner el gel en la cámara de incubación que contiene un secante húmedo y colocar la plantilla de aplicación del antisuero en la superficie del gel. **NOTA:** Asegurar el contacto entre la plantilla y el gel.
9. Aplicar 1µl del Control IFE adecuado a los pozos del gel. Cerrar la cámara de incubación y dejar que absorba completamente (3 minutos aproximadamente).
10. Aplicar 2 gotas de Protein Fixative a la vía SP y 2 gotas del antisuero adecuado en las vías de inmunoglobulina. Asegurar que el antisuero se distribuya de manera uniforme (incluidos los pozos de control) sacudiendo el gel.
11. Incubar el gel a una temperatura ente 15...30 °C durante 10 mminutos.
12. Finalizada la incubación, retirar la plantilla de antisuero lavando brevemente el gel con solución salina y agitando suavemente.

13. Colocar el gel en un secante D con la agarosa hacia arriba. Colocar un secante B (humedecido en solución salina) en la superficie del gel seguido de un secante X. Presionar el gel en un IFE Superpresa durante 5 minutos o utilizar un peso de desarrollo durante 10 minutos.
14. Retirar los secantes y colocar el gel en solución salina durante 4 minutos, agitando suavemente.
15. Colocar el gel en secante D con la agarosa hacia arriba. Colocar el secante B (humedecido en solución salina) en la superficie del gel, seguido del secante D. Presionar el gel en un IFE Superpress durante 1 minuto o utilizar un peso de desarrollo durante 3 minutos.
16. Retirar los secantes y secar el gel a una temperatura entre 60...70°C.
17. Sumergir el gel seco en la solución colorante durante 4 minutos.
18. Decolorar el gel en 2 lavados en solución colorante de dos minutos cada uno.
19. Lavar el gel brevemente en agua purificada y secar.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La mayoría de las proteínas monoclonales migran en la región gamma catódica del modelo de proteína, pero, debido a su naturaleza anómala, lo hacen a cualquier lugar de la región globulina durante la electroforesis de la proteína. La banda de proteínas monoclonales del modelo de inmunofijación adquirirá la misma posición y forma que la banda anómala en el modelo de proteína de suero. La proteína anómala se identifica mediante el tipo de antisuero ante el que reacciona.

Cuando están presentes pequeñas concentraciones de proteínas anómalas, la banda anómala puede aparecer como una banda dentro de la inmunoglobulina policlonal normal. También puede detectarse una banda dentro de un marco policlonal cuando hay una alta presencia de inmunoglobulina policlonal. Helena BioSciences le proporcionará un ejemplar de "Immunofixation for the Identification of Monoclonal Gammopathies" (Inmunofijación para la Identificación de Gammopatías Monoclonales) bajo petición previa.

LIMITACIONES

1. Exceso de antígeno

Habrà un exceso de antígeno si no hay un ligero exceso de anticuerpos o una equivalencia antígeno/anticuerpo en el lugar de la precipitación. Un exceso de antígeno en la inmunofijación se debe normalmente a un exceso de inmunoglobulina en la muestra del paciente. El exceso de antígeno se caracteriza por las prozonas (áreas no coloreadas en el centro de la banda de la proteína inmunofijada con coloración en los bordes). En estas situaciones, debería recurrirse a una mayor dilución de la muestra para mejorar la concentración de inmunoglobulina.

2. Precipitación No Específica en Todas las Vías de Inmunoglobulinas

Ocasionalmente, una placa IFE completada presenta una banda de precipitación en la misma posición en cada modelo a largo de la placa. Esto puede deberse a:

a) inmunoglobulinas monoclonales IgM

Las proteínas monoclonales IgM pueden adherirse a la matriz del gel. Aparecerá una banda en las 5 vías del antisuero del gel. Sin embargo, cuando la banda reacciona con un antisuero específico en la cadena pesada y la cadena liviana, se registrará un aumento en el tamaño y la intensidad del colorante en la banda, lo que permitirá identificar el tipo de inmunoglobulina. La dilución adicional de la muestra ayudará a distinguir entre la reacción del anticuerpo IgM y la coloración no específica de la precipitación de proteínas IgM en otras vías, simplificando así el diagnóstico.

b) Elevados Títulos de FR o Complejos Inmunes

Las muestras con elevados niveles del Factor Reumatoide (FR) u otros complejos inmunes pueden mostrar una banda de precipitación en el punto de aplicación de la muestra. Al reducir la muestra con DTT o β -2-mercaptoetanol, se puede eliminar esta reacción no específica (mezclar 190 μ L de suero diluido a 10 μ L de 1% (w/v) DTT en 0.85% de solución salina o mezclar 100 μ L de suero con 10 μ L de una dilución de 1:10 β -2-mercaptoetanol en agua. Realizar el IFE como de costumbre. **NOTA:** Trabajar siempre con una campana extractora cuando se utilice β -2 mercaptoetanol.

c) Fibrinógeno

Si hay fibrinógeno en la muestra, éste aparecerá como una banda discreta en todas las vías del modelo de inmunofijación. El fibrinógeno está presente en el plasma y algunas veces en el suero de pacientes con terapia anticoagulante.

3. Reactividad con antisueros Kappa o Lambda de cadena liviana, pero ninguna con los sueros de cadena pesada IgG, IgA o IgM

Las muestras que presentan estos modelos pueden tener o bien una gammopatía monoclonal de cadena liviana suelta o bien una proteína monoclonal IgD, o IgE. En este caso, deberá repetirse el IFE, sustituyendo los antisueros IgD y IgE por dos antisueros de cadena pesada. La imposibilidad de obtener una reacción con los antisueros IgD o IgE es indicativo de enfermedad de cadena suelta libre.

4. Una banda en la región gamma que no muestra reactividad con el antisuero IFE

C Pueden detectarse proteínas reactivas (CRP) en pacientes con respuestas inflamatorias agudas^{7,8}. Las CRP aparecen como una banda estrecha en el borde catódico del modelo de proteína de suero. Altos niveles de Antitripsina-Alfa 1 y de Haptoglobina son síntomas de CRP. Es probable que los pacientes con una banda CRP tengan un nivel elevado de CRP cuando les hagan la prueba. Una banda estrecha en el punto de aplicación de la muestra se puede observar algunas veces, lo que puede deberse a *chylomicrones* en el suero o proteínas precipitadas en muestras que se han almacenado congeladas.

5. Falta de reactividad con antisueros Kappa y Lambda

En algunas ocasiones, una muestra reaccionará a un antisuero fuerte pero no a uno suave. En esta situación, debe descartarse lo siguiente: a) enfermedad grave, b) concentraciones muy altas de cadenas ligeras que conllevan un exceso de antígeno, c) concentraciones bajas de cadenas ligeras, d) moléculas atípicamente ligeras que no reaccionan a antisueros, e) cadenas ligeras con factores determinantes de cadenas ligeras “escondidas” (como ocurre en algunas situaciones con IgA y IgD). Para obtener resultados definitivos, las pruebas deben incluir a) una dilución mayor o menor de la muestra para mejorar la equivalencia anticuerpo/antígeno, b) antisueros de más de un fabricante para ayudar a identificar las inmunoglobulinas atípicas, y c) tratamiento de la muestra con β -2-mercaptoetanol para “revelar” las cadenas ligeras.

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Se testaron y compararon una serie de muestras con otro kit disponible en el mercado. Ambos kits mostraron resultados equivalentes resultados equivalentes mostrados.

MATERIALES ADICIONALES OPCIONALES

no de catálogo 9249 Antisuero para el IgD Humano

no de catálogo 9250 Antisuero para el IgE Humano

no de catálogo 9412 Antisuero para las cadenas humanas sueltas y ligeras Kappa

no de catálogo 9413 Antisuero para las cadenas humanas sueltas y ligeras Lambda

BIBLIOGRAFÍA

1. Alfonso, E., 'Quantitation Immuno-electrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
2. Alper, C.A y Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox. 445-452.
3. 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, Nueva York.
4. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of α 1-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of PiM.', J. Lab. Clin. Med., 1976 ; 87 (1) : 152-163.
5. 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. Sang., 1976; 22 : 1262-1268.
6. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Sang., 1976; 22 : 1982-1985.
7. Jeppsson, J.O., Laurell, C.B., and Franzén, B. 'Agarose Gel Electrophoresis', Clin. Chem., 1979; 25(4) : 629-638.
8. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. y Tyllia, M.M. 'Protein Analysis', Diagnostic Medicine, 1980; Jan/Feb : 3-15.

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
www.helena-biosciences.com

HL-2-1278P 2008/01 (8)