

helena | BioSciences
Europe
www.helena-biosciences.com

Helena BioSciences Europe
Colima Avenue
Sunderland Enterprise Park
Sunderland
SR5 3XB
tel: +44 (0) 191 549 6064
fax: +44 (0) 191 549 6271
email: info@helena-biosciences.com

Other Helena BioSciences Europe offices:

Helena BioSciences Europe
6 Rue Charles Cros-ZAE
95320 Saint Leu La Foret
France
tel: +33 13 995 9292
fax: +33 13 995 6891
email: helena@helena.fr

Helena BioSciences Europe
Via Enrico Fermi, 24
20090 Assago (Milano)
Italy
tel: +39 02 488 1951
or +39 02 488 2141
fax: +39 02 488 2677



HL-2-1302P 2003.08 (8)

helena | BioSciences
Europe
www.helena-biosciences.com

Instructions For Use

SAS-MX Urine IFE
Cat. No. 100600

SAS-MX IFE Urinaires
Fiche technique
Réf. 100600

SAS-MX Urin-IFE
Anleitung
Kat. Nr. 100600

SAS-MX IFE per Urina
Istruzioni per l'uso
Cod. 100600

IFE para orina SAS-MX
Instrucciones de uso
No de catálogo 100600

Contents

English	1
Français	6
Deutsch	11
Italiano	16
Español	21

SAS-MX URINE IFE

INTENDED PURPOSE

The SAS-MX Urine IFE Kit is intended for the identification of urinary proteins by agarose gel electrophoresis followed by immunofixation of the proteins in the gel.

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}.

Alfonso first described immunofixation in the literature in 1964⁴. Alper and Johnson published a more practical procedure in 1969, and published a number of studies utilising this technique^{7,8}. Immunofixation has been used as a procedure for the investigation of immunoglobulins since 1976⁹⁻¹¹. 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 Dysglobulinaemias⁵.

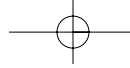
The SAS-MX Urine IFE kit separates urine proteins according to charge in an agarose gel. The proteins are then incubated with monospecific antisera, washed and stained to allow visualization of the immunoprecipitate for qualitative interpretation.

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 Urine IFE Gel**
Contains agarose in a barbital buffer with sodium azide as preservative. The gel is ready for use as packaged.
- 2. Tris / Barbital Buffer Concentrate**
Contains concentrated Tris / Barbital buffer with sodium azide as preservative. Dilute the contents of the bottle in 1 litre of purified water and mix well.
- 3. Urine Protein Stain**
Contains Coomassie Blue stain powder. The powdered stain is stable until the expiry date indicated on the label. Dissolve the contents of the vial in 1 litre of 50% methanol and stir overnight. Acidify by adding 20ml of glacial acetic acid. Mix well and filter before use.
- 4. SAS-MX Urine IFE Antisera Kit**
Contains antisera to a) Human Serum/Urine Proteins, b) Urine Micro Proteins (beta-2 microglobulin and retinol binding protein), c) Urine Macro Proteins (Transferrin and alpha-1-antitrypsin), d) IgG,A,M heavy chains, e) Kappa light chains (free and bound) and f) Lambda light chains (free and bound). All antisera contain sodium azide as a preservative. The antisera is ready for use as packaged.
- 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.



SAS-MX URINE IFE

STORAGE AND SHELF-LIFE

1. SAS-MX Urine 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 / Barbital 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. Urine Protein Stain

The powdered stain should be stored at 15...30°C and is stable until the expiry date indicated on the label. Dissolved stain 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.

4. SAS-MX Urine 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. 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

Destain solution: Mix 1300ml of purified water and 300ml methanol. Add 400ml of glacial acetic acid.

Store in a tightly stoppered bottle.

Saline Solution (0.85% NaCl)

Purified water

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

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

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

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

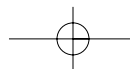
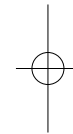
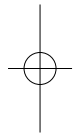
Cat. No. 221000 Antiserum to Human Pentavalent (2ml)

SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Freshly collected urine 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. Samples for the Total Lane should have a concentration of 1g/L or less the other lanes should be 5g/L or less. Some samples may require special treatment such as concentration if the total protein is low or dilution if the total protein is high, or if the light chains are poor reacting. See LIMITATIONS for more information.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

1. Remove the gel from the packaging and place on a paper towel. 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 3µl of sample to each slit and allow to absorb for 5 minutes.
4. Whilst the samples are absorbing, pour 25ml of buffer into each inner section of the SAS-MX Chamber.
5. Following sample absorption, blot the template with the blotter A retained in 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, 40 minutes.
8. Following electrophoresis, place the gel in 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 2 drops of the appropriate antiserum / fixative into each lane. Ensure even distribution of antiserum in the lane by rocking the gel.
10. Incubate the gel at 15...30°C for 15 minutes.
11. Following incubation, remove the antiserum template by washing the gel in saline solution for 5 minutes with gentle agitation.
12. 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.
13. Remove the blotters and place the gel in saline solution for 10 minutes with gentle agitation.
14. 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.
15. Remove the blotters and dry the gel at 60...70°C.
16. Immerse the dry gel in stain solution for 5 minutes.
17. Destain the gel in 2 x 15 second washes of destain solution.
18. Wash the gel briefly in purified water and dry.



SAS-MX URINE IFE**INTERPRETATION OF RESULTS**

The possible identity of proteins present in the sample can be determined by comparing bands present in the total protein pattern with those present in the other lanes.

Qualitative Evaluation / visual interpretation of bands present on the gel:

Type of Proteinuria	Bands Observed On Gel	Proteins Present
Normal urine	small albumin band	albumin
Glomerular	albumin, alpha-1, beta, gamma	albumin, alpha-1 antitrypsin, transferrin, gamma globulins
Tubular	alpha-1, alpha-2, beta	Retinol Binding Protein, beta-2 microglobulin, alpha-2 microglobulin.
Overflow	gamma or variable	immunoglobulins, free light chains

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. Band In Cathodic End of 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 Alpha-1-Antitrypsin and Haptoglobin are supportive evidence for CRP. Patients with a CRP band will probably have an elevated level when assayed for CRP.

3. Non-Reactivity With Kappa and Lambda Antisera

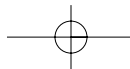
Occasionally a sample will have a reaction with a heavy chain antiserum but no light chain reaction is obvious. In this situation, the following need to be ruled out - a) Heavy chain disease, b) Very high concentrations of light chains, leading to antigen excess, c) Low concentrations of light chains, 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.

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. Alfonso, 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 P.M.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
10. Cawley, L.P. et al. '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.



UTILISATION

Le kit SAS-MX IFE urinaire est utilisé pour l'identification des protéines urinaires par électrophorèse en gel d'agarose suivie d'une immunofixation des protéines.

Les protéines urinaires proviennent principalement de la filtration des protéines plasmatiques par le rein. L'apparition de protéines plasmatiques anormales dans l'urine est un élément important 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 de protéines excrétées.

Alfonso a été le premier à décrire l'immunofixation dans la littérature en 1964⁶. Alper et Johnson ont publié une procédure plus simple en 1969, puis de nombreuses études utilisant cette technique^{7,8}.

L'immunofixation est utilisée comme procédure pour l'étude des immunoglobulines depuis 1976^{9,11}. La séparation électrophorétique des protéines urinaires, unie à l'identification des types de protéines spécifiques par immunoprécipitation, permet de différencier plusieurs types de protéinuries : physiologique, glomérulaire (sélective et non sélective), tubulaire et protéinurie associée à une dysglobulinémie¹².

Le kit SAS-MX IFE urinaire sépare les protéines urinaires en fonction de 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.

PRÉCAUTIONS

Tous les réactifs sont à usage diagnostic 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 urinaire

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

2. Tampon concentré Tris / Barbital

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 Protéines urinaires

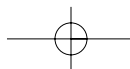
Contient du bleu de Coomassie en poudre. Le colorant en poudre est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Dissoudre le contenu du flacon dans 1 litre de méthanol 50% et laisser sous agitation toute une nuit. Acidifier en ajoutant 20ml d'acide acétique glacial. Bien mélanger et filtrer avant utilisation.

4. Kit antisérums SAS-MX IFE urinaire

Contient des antisérums dirigés contre a) protéines humaines sériques et urinaires, b) microprotéines urinaires (B-2 microglobuline et protéine de liaison du rétinol (RBP), c) macroprotéines urinaires (transferrine et a-I antitrypsine), d) chaînes lourdes IgG, A et M e) chaînes légères kappa (libre et liée), f) chaînes légères lambda (libre et liée). Tous les antisérums contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. Les antisérums sont prêts à l'emploi.

5. Autres composants du kit

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



SAS-MX IFE URINAIRES

STOCKAGE ET CONSERVATION

1. Plaque SAS-MX IFE urinaire

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 / Barbital

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 Protéines urinaires

Le colorant en poudre doit être conservé entre 15...30°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Le colorant dissous 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. Kit antisérums SAS-MX IFE urinaire

Le kit d'antisérums doit être conservé entre 2...6°C; il est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Un aspect floconneux ou une contamination indique une détérioration du produit.

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 décolorante: Mélanger 1300ml d'eau distillée avec 300ml de méthanol. Ajouter 400ml d'acide acétique glacial. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

Solution physiologique (0,85% NaCl)

Eau distillée

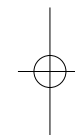
Les produits suivants ne sont pas nécessaires pour une IFE urinaire standard, mais ils peuvent l'être en cas d'investigations supplémentaires:

Réf. 220500 Antisérum anti chaîne légère libre kappa de l'urine humaine (2ml)

Réf. 220600 Antisérum anti chaîne légère libre lambda de l'urine humaine (2ml)

Réf. 220900 Antisérum anti albumine/pentavalent de l'urine humaine (2ml)

Réf. 221000 Antisérum anti pentavalent humain (2ml)



PRÉLÈVEMENTS DES ÉCHANTILLONS

L'utilisation d'urine fraîchement recueillie est fortement recommandée. Les échantillons peuvent être conservés 72 heures entre 2...6°C ou 2 semaines à -20°C. Les échantillons doivent avoir une concentration de 1g/l au plus pour la case Total et de 5 g/l au plus pour les autres cases. Il est possible que certains échantillons doivent recevoir un traitement spécifique comme une concentration si le taux de protéine est trop faible ou une dilution si celui-ci est trop fort ou que la réaction avec les chaînes légères est faible. Voir la section LIMITES pour plus amples renseignements.

MÉTHODOLOGIE

- Sortir le gel de son emballage et le déposer sur un papier absorbant. Sécher la surface du gel à l'aide d'un buvard C, jeter le buvard.
- 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.
- Déposer 3µl d'échantillon sur chaque fente et laisser absorber 5 minutes.
- Pendant ce temps, verser 25ml de tampon dans chaque compartiment intérieur de la chambre de migration SAS-MX.
- 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.
- Placer le gel, agarose vers le haut, dans la chambre de migration, en respectant les polarités.
- Faire migrer à 120 volts pendant 40 minutes.
- 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.
- Déposer 2 gouttes de l'antisérum approprié / solution fixative dans chaque case. Incliner le gel afin de permettre une bonne répartition de celui-ci.
- Incuber le gel entre 15...30°C pendant 15 minutes.
- Une fois l'incubation terminée, retirer le masque applicateur par lavage rapide dans un bain de solution physiologique sous agitation douce.
- 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 utiliser un poids à développement pendant 10 minutes.
- Retirer les buvards et placer le gel dans un bain de solution physiologique sous agitation douce pendant 10 minutes.
- 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 utiliser un poids à développement pendant 3 minutes.
- Retirer les buvards et sécher le gel entre 60...70°C.
- Plonger le gel sec dans le colorant pendant 5 minutes.
- Décolorer le gel dans 2 bains successifs de 15 secondes de solution décolorante.
- Rincer rapidement sous un jet d'eau distillée et sécher.

SAS-MX IFE URINAIRES**INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS**

Il est possible d'identifier les protéines présentes dans l'échantillon en comparant les bandes présentes sur le protéinogramme total et celles présentes dans les autres cases.

Évaluation qualitative / Interprétation visuelle des bandes présentes sur le gel:

Type de protéinurie	Bandes observées sur le gel	Protéines présentes
Urine normale	Petite bande d'albumine	Albumine
Glomérulaire	Albumine, alpha-1, bêta, gamma	Albumine, alpha-1 antitrypsine, transferrine, gammaglobulines
Tubulaire	Alpha-1, alpha-2, bêta	Protéine de liaison du rétinol, β-2 microglobuline, α-2 microglobuline
Surcharge	Gamma ou autres	Immunglobulines, chaînes légères libres

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. Bande sur le côté cathodique (extrémité de la zone gamma) indiquant l'absence de réaction avec les antisérums de l'immunofixation

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.

3. 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) utiliser des antisérums de plusieurs fabricants afin de vous aider à identifier les immunoglobulines atypiques et c) traiter l'échantillon avec du β-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.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fauchier, P. et Catalan, F. 'Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis' Alfred Fournier Institute, Paris, France, 1988.
2. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. et Tyllia, M.M. 'Finding Clues to Disease in Urine' Diagnostic Medicine, 1980 ; mai/juin : 69-75.
3. Umbreit, A. et 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. et 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. et Lockhart, S. 'A Comparison of Three Procedures for the Detection of Bence-Jones Proteinuria' Ann. Clin. Biochem., 1997, 34 : 371-374.
6. Alfonso, E., 'Quantitation Immunoelectrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964 ; 10 : 114-122.
7. Alper, C.A et 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 P.M.', J. Lab. Clin. Med., 1976 ; 87 : 152-163.
10. Cawley, L.P. et al. 'Immunofixation Electrophoretic Technique Applied to Identification of Proteins in Serum and Cerebrospinal Fluid', Clin. Chem., 1976 ; 22 : 1262-1268.
11. Ritchie, R.F et Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Chem., 1976 ; 22 : 1982-1985.

SAS-MX URIN-IFE**ANWENDUNGSBEREICH**

Der SAS-MX Urin-IFE Kit dient zur Identifizierung von Proteinen im Urin durch Agarose-Gel-Elektrophorese mit anschließender Immunfixation der Proteine im Gel.

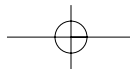
Proteine im Urin stammen hauptsächlich von durch die Niere gefilterten Plasmaproteinen ab. Das Vorkommen pathologischer Plasmaproteine im Urin ist bei der Beurteilung der Nierenfunktion von großer Bedeutung. Die richtige Studie der Proteinurie sollte quantitative und qualitative Untersuchungen von Typ und Menge der ausgeschiedenen Proteine umfassen^{1,5}. 1964 beschrieb Alfonso zum ersten Mal die Immunfixation in der Literatur⁶. Alper und Johnson veröffentlichten 1969 eine etwas praktischere Vorgehensweise und veröffentlichten auch eine Anzahl von Studien, in denen diese Technik angewendet wurde^{7,8}. Die Immunfixation wird als Methode seit 1976 zur Untersuchung von Immunglobulinen verwendet^{9,11}. Die Kombination der elektrophoretischen Auftrennung der Urin-Proteine und Bestimmung bestimmter Proteintypen durch Immunpräzipitation erlaubt eine Unterteilung mehrerer Proteinurieformen: physiologische, glomeruläre (selektiv und nicht-selektiv), tubuläre sowie Proteinurie, die mit Dysglobulinämie im Zusammenhang steht^{1,5}. Mit dem SAS-MX Urin IFE-Kit werden Urin-Proteine im Agarose-Gel nach ihrer Ladung 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 Urin IFE-Gel**
Enthält Agarose in einem Barbitallpuffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.
2. **Tris-Barbital-Pufferkonzentrat**
Enthält konzentriertes Tris-Barbital-Puffer mit Natriumazid als Konservierungsmittel. Den Inhalt der Flasche mit dest. Wasser auf 1 Liter verdünnen. Gut schütteln.
3. **Urin-Protein Färbung**
Enthält Färbepulver "Coomassie Blue". Der pulverisierte Farbstoff ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum auf dem Etikett haltbar. Den Inhalt des Fläschchens in 1 Liter 50 %-igem Methanol auflösen und über Nacht rühren. Mit 20ml Eisessig ansäuern. Gut schütteln und vor Gebrauch filtrieren.
4. **SAS-MX Urin IFE Antiseren Kit**
Enthält Antiseren gegen a) Humanserum/Urin-Proteine, b) Mikroproteine im Urin (Beta-2-Mikroglobulin und Retinol bindendes Protein), c) Makroproteine im Urin (Transferrin und Alpha-1-Antitrypsin), d) IgG-, IgA-, IgM-Schwerketten, e) kappa-light-Ketten (freie und gebundene) und f) lambda-light-Ketten (freie und gebundene). Alle Antiseren enthalten 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel. Das Gel ist gebrauchsfertig verpackt.
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 Urin 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. Urin-Protein Färbung

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

4. SAS-MX Urin IFE Antiseren Kit

Das Kit mit den Antiseren sollte bei 2...6°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum auf dem Etikett stabil. Teilweise Verunreinigung oder Trübung können auf einen 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-Presse oder Kat. Nr. 5014 Entwicklungsgewicht

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

Entfärbelösung: 1.300ml dest. Wasser mit 300ml Methanol mischen. 400ml Eisessigsäure hinzufügen.

In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

Kochsalzlösung (0,85% NaCl)

Dest. Wasser

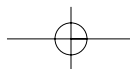
Folgende Produkte werden für den Urin-IFE Standardtest nicht benötigt, können aber zur weiteren Untersuchung erforderlich sein.

Kat. Nr. 220500 Antihumanserum freie kappa-light-Ketten (2ml)

Kat. Nr. 220600 Antihumanserum freie kappa-light-Ketten (2ml)

Kat. Nr. 220900 Antihumanserum Pentavalent/Albumin im Urin (2ml)

Kat. Nr. 221000 Antihumanserum Pentavalent (2ml)



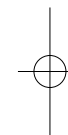
SAS-MX URIN-IFE

PROBENAHE UND VORBEREITUNG

Frischer Urin ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Proben können bis zu 72 Stunden bei 2...6°C oder 2 Wochen bei -20°C gelagert werden. Proben für die Gesamtspur sollten eine Konzentration von 1g/l oder weniger, die anderen Spuren sollten 5 g/l oder weniger haben. Bei einigen Proben ist eventuell eine besondere Behandlung erforderlich, wie z.B. Konzentrierung, wenn der Gesamtproteingehalt niedrig ist oder Verdünnung, wenn der Gesamtproteingehalt hoch ist oder die Leichtketten schlecht reagieren. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt EINSCHRÄNKUNGEN.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

- Das Gel aus der Verpackung nehmen und auf ein Papiertuch legen. Die Geloberfläche mit einem Blotter C blotten und Blotter werfen.
- 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.
- 3µl Probe in die jeweiligen Schablonenschlitze pipettieren. Probe für 5 Minuten ins Gel diffundieren lassen.
- Während die Probe einwirkt, 25ml Puffer in jeden der inneren Bereiche der SAS-MX-Kammer füllen.
- Nach Absorption der Probe den Blotter A aus Schritt 2 auf die Schablone drücken. Anschließend Schablone und Blotter entfernen.
- Das Gel, Agaroseseite nach oben, in die Kammer spannen und auf übereinstimmende Polarisierung achten (Pluszeichen auf dem Gel und Pluszeichen in der Kammer).
- Gel-Elektrophorese durchführen: 120 Volt, 40 Minuten.
- 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.
- 2 Tropfen des entsprechenden Antiserums / Fixativs in jede Spur pipettieren. Durch Schwenken für eine gleichmäßige Verteilung des Antiserums in der Spur sorgen.
- Gel für 15 Minuten bei 15...30°C inkubieren.
- Nach der Inkubation die Schablone für das Antiserum durch 5-minütiges Abspülen des Gels mit Kochsalzlösung bei sanfter Bewegung entfernen.
- 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.
- Die Blotter entfernen und das Gel 10 Minuten unter sanfter Bewegung in Kochsalzlösung waschen.
- 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.
- Die Blotter entfernen und das Gel bei 60...70°C trocknen.
- Das trockene Gel 5 Minuten in der Färbelösung färben.
- Das Gel in zwei jeweils 15 Sekunden dauernden Waschworgängen mit Entfärbelösung entfärben.
- Gel kurz mit dest. Wasser abspülen und trocknen.



SAS-MX URIN-IFE**INTERPRETATION DER ERGEBNISSE**

Die mögliche Identität der in der Probe vorhandenen Proteine lässt sich durch einen Vergleich der im Gesamteiweißmuster vorhandenen Banden mit denen in den anderen Spuren bestimmen.

Qualitative Beurteilung / visuelle Auswertung der auf dem Gel vorhandenen Banden:

Art der Proteinurie	Auf dem Gel beobachtete Banden	Anwesende Proteine
Normaler Urin Glomerulär	Kleine Albuminbande Albumin, Alpha-1, Beta, Gamma	Albumin Albumin, Alpha-1 Antitrypsin, Transferrin, Gammaglobuline
Tubulär	Alpha-1, Alpha-2, Beta	Retinol bindendes Protein, Beta-2 Mikroglobulin, Alpha-2 Mikroglobulin
Überlauf	Gamma oder Variable	Immunglobuline, freie Leichtketten

EINSCHRÄNKUNGEN**1. Antigenüberschuss**

Antigenüberschuss tritt auf, wenn am Präzipitationsort 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 Kantensbereich) charakterisiert. In diesem Fall sollte zur Optimierung der Immunglobulin-Konzentration die Probe höher verdünnt werden.

2. Bande am Katodenende der Gammaregion zeigt keine Reaktivität mit den IFE-Antiseren

C-reaktives Protein (CRP) kann bei Patienten mit akuter entzündlicher Reaktion nachgewiesen werden⁷⁸. CRP erscheint als schmale Bande an der Katodenseite des Serum-Proteinmusters. Erhöhtes Alpha-1-Antitrypsin und Haptoglobin bestärkt die Anwesenheit von CRP. Bei Patienten mit einer CRP-Bande lassen sich wahrscheinlich auch erhöhte CRP-Werte feststellen.

3. Keine Reaktivität mit Kappa- und Lambda-Antiserum

Gelegentlich reagiert eine Probe mit einem Schwereketten-Antiserum, ohne dass eine Reaktion mit einem Leichtketten-Antiserum ersichtlich ist. In diesem Fall muss Folgendes ausgeschlossen werden - a) Schwerekettenkrankheit, 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" Leichtketten determinanten (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) Antiseren verschiedener Hersteller, um die Identifizierung atypischer Immunglobuline zu unterstützen und c) Behandlung der Probe mit Mercaptoethanol, um die Leichtketten zu "enthüllen".

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.

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. Alfonso, 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 P.M.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
10. Cawley, L.P. et al. '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.

PRINCIPIO

Il kit SAS-MX IFE per urina è stato formulato per l'identificazione delle proteine urinarie attraverso elettroforesi con gel di agarosio seguita da immunofissazione.

Le proteine presenti nell'urina derivano principalmente dalle proteine plasmatiche filtrate dal rene. La comparsa di proteine del plasma anomale nell'urina è estremamente importante per la valutazione della funzionalità renale. Un accurato esame della proteinuria deve comprendere una valutazione quantitativa e qualitativa del tipo e della quantità di proteine escrete.⁵

Il primo a descrivere l'immunofissazione in letteratura nel 1964⁴ fu Alfonso. Alper e Johnson pubblicarono una procedura più pratica nel 1969, oltre ad una serie di studi in cui veniva utilizzata questa tecnica.^{7,8} A partire dal 1976, l'immunofissazione è stata usata come procedura per lo studio delle immunoglobuline.^{9,11}

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.^{4,5}

Il kit SAS-MX IFE per urina separa le proteine urinarie 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. Per le indicazioni relative ai rischi e alla sicurezza e le informazioni sullo smaltimento, fare riferimento alle schede tecniche dei prodotti.

COMPOSIZIONE**1. Piastre SAS-MX IFE**

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

2. Tampone Concentrato Tris / barbital

Contiene tampone concentrato Tris / barbital con sodio azide aggiunto come conservante. Prima dell'uso, diluire l'intero contenuto del flacone con 1 litro di acqua distillata e miscelare bene.

3. Colorante concentrato per proteine urinarie

Contiene colorante concentrato Coomassie Blu. Il colorante concentrato è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Sciogliere il contenuto della fiala in 1 litro di metanolo al 50% e agitare durante la notte. Acidificare aggiungendo 20 ml di acido acetico glaciale. Miscelare bene e filtrare prima dell'uso.

4. Kit di antisieri IFE per urina

Contiene antisieri per: a) Siero umano/proteine urinarie, b) Microproteine urinarie (beta-2-microglobulina e proteina legante retinolo), c) Macroproteine urinarie (transferrina e alfa-1-antitripsina), d) catene pesanti di IgG,A,M, e) catene leggere kappa (libere e legate) e f) catene leggere lambda (libere e legate). Tutti gli antisieri contengono sodio azide come conservante. Gli antisieri sono forniti pronti per l'uso.

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.

SAS-MX IFE PER URINA**CONSERVAZIONE E STABILITÀ****1. Piastre SAS-MX IFE**

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 indicata sull'etichetta. 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 concentrato per proteine urinarie

Il colorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C ed è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Il colorante disciolto 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.

4. Kit di antisieri IFE per urina

Il kit di antisieri deve essere conservato a 2...6°C ed è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Contaminazione particellare o torbidità possono indicare il 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 Decolorante: Miscelare 1300ml di acqua distillata con 300ml di metanolo. Aggiungere 400ml di acido acetico glaciale. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

Soluzione fisiologica (0,85% NaCl)

Acqua distillata

I seguenti materiali non sono necessari per l'IFE per urina standard, ma potrebbero servire per ulteriori studi:

Cod. 220500 Antisiero per catena leggera kappa libera umana (2ml)

Cod. 220600 Antisiero per catena leggera lambda libera umana (2ml)

Cod. 220900 Antisiero Urine Pentavalente / Albumina (2ml)

Cod. 221000 Antisiero Pentavalente (2ml)

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

L'urina fresca rappresenta il campione di preferenza. I campioni possono essere conservati in frigorifero fino a 72 ore a 2...6°C o 2 settimane a -20°C. I campioni per la linea delle proteine totali devono avere una concentrazione di 1g/l o inferiore; per le altre linee la concentrazione deve essere pari a 5g/l o inferiore. Alcuni campioni possono richiedere un trattamento speciale, come la concentrazione se la quantità di proteine totali è bassa, oppure la diluizione se al contrario è alta o se le catene leggere sono poco reattive. Vedi il paragrafo LIMITAZIONI per maggiori informazioni.

PROCEDURA

1. Rimuovere il gel dalla confezione e collocarlo su una bibula. Asciugare la superficie del gel con un blotter C e poi eliminarlo.
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 3µl di campione in ogni fessura di semina e lasciare assorbire per 5 minuti.
4. Durante l'assorbimento dei campioni, collocare 25ml di tampone in ogni compartimento interno della camera di migrazione.
5. Dopo l'assorbimento dei campioni, asciugare la mascherina con il blotter A, conservato dal punto 2, quindi rimuovere sia il blotter sia la mascherina.
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 40 minuti.
8. Al termine dell'elettroforesi, collocare il gel in una camera d'incubazione contenente un blotter bagnato e posizionare la mascherina di applicazione dell'antisiero sulla superficie del gel.
NOTA: Verificare il corretto contatto fra la mascherina ed il gel.
9. Applicare due gocce dell'appropriato antisiero / o fissativo in ogni linea. Assicurare una distribuzione uniforme dell'antisiero in tutta la linea agitando opportunamente il gel.
10. Incubare il gel a 15...30°C per 15 minuti.
11. Al termine dell'incubazione, rimuovere la mascherina degli antisieri lavando il gel brevemente in fisiologica per 5 minuti.
12. 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.
13. Rimuovere i blotter e mettere il gel nella soluzione fisiologica per 10 minuti agitando delicatamente.
14. 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.
15. Togliere i blotter ed asciugare il gel a 60...70°C.
16. Immergere il gel asciutto nella soluzione colorante per 5 minuti.
17. Decolorare il gel in 2 lavaggi di 15 secondi nella soluzione decolorante.
18. Sciacquare velocemente il gel con acqua distillata e asciugare.

SAS-MX IFE PER URINA**INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

E' possibile determinare l'identità delle proteine presenti nel campione confrontando le bande presenti nella linea delle proteine totali con quelle presenti nelle altre linee.

Valutazione qualitativa / interpretazione visiva delle bande presenti sul gel:

Tipo di proteinuria	Bande osservate sul gel	Proteine presenti
Urina normale Glomerulare	Banda di albumina piccola Albumina, alfa-1, beta, gamma	Albumina Albumina, alfa-1 antitripsina, transferrina, gammaglobuline
Tubulare	alfa-1, alfa-2, beta	Proteina legante retinolo, beta-2-microglobulina, alfa-2-microglobulina
Da iperafflusso	Gamma o variabile	Immunoglobuline, catene leggere libere

LIMITAZIONI**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. Banda all'estremità catodica della regione gamma, che non presenta alcuna reattività con gli antisieri IFE

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.

3. 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 risultati definitivi, l'analisi può includere a) una diluizione superiore o inferiore del campione per ottimizzare l'equivalenza anticorpo/antigene, b) antisieri provenienti da più di un produttore in modo da identificare le immunoglobuline atipiche, e c) trattamento del campione con mercaptoetanolo β-2 per 'rivelare' le catene leggere.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

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

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. Alfonso, 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 α 1-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of P.M.', J. Lab. Clin. Med., 1976; 87 : 152-163.
10. Cawley, L.P. et al. '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.

IFE PARA ORINA SAS-MX**USO PREVISTO**

El kit IFE Orina SAS-MX tiene por objeto identificar las proteínas de la orina mediante electroforesis en gel de azarosa, seguido por la inmunofijación de las proteínas en el gel.

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. El estudio adecuado de la proteinuria debe incluir valoraciones cuantitativas y cualitativas del tipo y cantidad de las proteínas excretadas¹⁵. Alfonso fue el primero en describir la inmunofijación en la literatura de 1964⁶. Alper y Johnson publicaron un procedimiento más práctico en 1969, así como una serie de estudios en los que se utilizó esta técnica^{7,8}. La inmunofijación se ha utilizado como un procedimiento para la investigación de las inmunoglobulinas desde 1976^{9,11}.

La combinación de la separación de las proteínas de la orina por electroforesis junto con la identificación de tipos específicos de proteínas por inmunoprecipitación permite distinguir diversos tipos de proteinuria, fisiológica⁵ glomerular (selectiva y no selectiva), tubular, así como la proteinuria asociada con la disglobulinemia⁵.

El kit IFE Orina SAS-MX separa las proteínas de la orina de acuerdo con la carga en un gel de agarosa. Después de esto se incuban las proteínas con antiseros mono-específicos, 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 para orina SAS-MX**

Contiene agarosa en un tampón de barbital con azida de sodio como conservante. El gel viene envasado listo para usar.

2. Concentrado tampón de Tris-Barbital

Contiene concentrado tampón de Tris-barbital con azida de sodio como conservante. Diluir el contenido de un frasco en 1 litro de agua purificada y mezclar bien.

3. Colorante de proteínas de la orina

Contiene polvo colorante azul Coomassie. El polvo es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del bote. Disolver el contenido del vial en 1 litro con 50% de metanol y dejar removiendo toda la noche. Acidificar añadiendo 20ml de ácido acético cristalizado. Mezclar bien y filtrar antes de usar.

4. Kit Antiseros de Inmunofijación por Electroforesis (IFE) de la Orina SAS-MX

Contiene antiseros para: a) suero humano/proteínas de la orina, b) microproteínas de la orina (beta-2 microglobulina y proteína ligada al retinol), c) macroproteínas de la orina (transferina y alfa-1-antitripsina), d) cadenas pesadas IgG, A y M, e) cadenas ligeras Kappa (sueltas y ligadas) y f) cadenas ligeras Lambda (sueltas y ligadas). Todos los antiseros contienen azida de sodio como conservante. El gel viene envasado listo para usar.

5. Otros componentes del kit

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

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ**1. Gel IFE para orina SAS-MX**

Los gels han de almacenarse a una temperatura entre 15...30°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad 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. Concentrado 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 permanece estable durante 2 meses a una temperatura entre 15...30°C. Turbiedad o un mal comportamiento del tampón diluido pueden ser indicios de deterioro.

3. Colorante de proteínas de la orina

El colorante en polvo debe almacenarse a una temperatura entre 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. La solución colorante preparada permanece 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. Kit Antisueros de Inmunofijación por Electroforesis (IFE) de la Orina SAS-MX

El kit de antisueros debe guardarse a una temperatura entre 2...6°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco. La contaminación por partículas o la aparición de turbidez puede ser indicio 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 Development Weight

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

Solución decolorante: Mezclar 1.300ml de agua purificada con 300ml de metanol. Añadir 400ml de ácido acético cristalizado. Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

Solución Salina (0,85% NaCl)

Agua purificada.

Los siguientes artículos no son necesarios para la inmunofijación por electroforesis (IFE) de la orina, pero puede que se requieran para investigaciones posteriores.

no de catálogo 220500 Antisuero para las cadenas humanas sueltas y ligeras Kappa (2ml)

no de catálogo 220600 Antisuero para las cadenas humanas sueltas y ligeras Lambda (2ml)

no de catálogo 220900 Antisuero para la Orina Humana Pentavalente/Albúmina(2ml)

no de catálogo 221000 Antisuero para Pentavalentes Humanas (2ml)

IFE PARA ORINA SAS-MX**RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

La muestra elegida es orina recién recogida. Las muestras pueden guardarse en el frigorífico a una temperatura entre 2...6°C hasta 72 horas o durante 2 semanas a -20°C. Las muestras para la Vía Total deberán tener una concentración de 1g/L o menor, las otras vías deberán tener una concentración de 5g/L o menor. Algunas muestras requieren un tratamiento especial como concentración si la proteína total es baja o dilución si ésta elevada o si las cadenas ligeras tienen poca reactividad. Para más información, ver las LIMITACIONES.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

1. Sacar el gel del envase y colocarlo sobre una toallita de papel. Secar la superficie del gel con un secante C, luego 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 3µl de muestra en cada ranura y dejar que absorba durante 5 minutos.
4. Mientras la muestra es absorbida, verter aproximadamente 25ml del concentrado tampón en cada hueco interior de la cámara SAS-MX.
5. Finalizada la absorción de la muestras, secar la plantilla con el secante A que se ha conservado del paso 2 y 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. Realizar la electroforesis del gel: 120 voltios, 40 minutos
8. Finalizada la electroforesis, colocar 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 2 gotas del antisuero/fijador apropiado en cada vía. Asegurar una distribución uniforme del antisuero en la vía removiendo el gel.
10. Incubar el gel a una temperatura entre 15 y 30°C durante 15 minutos.
11. Finalizada la incubación, retirar la plantilla del antisuero lavando el gel en solución salina durante 5 minutos, agitando suavemente.
12. Colocar el gel en un secante D con la agarosa hacia arriba. Colocar el secante B (humedecido en solución salina) en la superficie del gel, seguido del secante X. Presione el gel en un IFE SuperPess durante 5 minutos o utilice una pesa de desarrollo durante 10 minutos.
13. Retirar los secantes y colocar el gel en solución salina durante 10 minutos, agitando suavemente.
14. 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 por un secante D. Presione el gel en un Superpresa durante 1 minuto o utilice una pesa de desarrollo durante 3 minutos.
15. Retirar los secantes y secar el gel a una temperatura entre 60...70°C.
16. Sumergir el gel seco en la solución colorante durante 5 minutos.
17. Decolorar el gel en 2 lavados de 15 minutos en solución decolorante.
18. Lavar el gel brevemente en agua purificada y secar.

IFE PARA ORINA SAS-MX**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

Se pueden determinar las posibles proteínas existentes en la muestra comparando las bandas existentes en los modelos de proteínas totales con aquellas existentes en otras vías.

Evaluación cualitativa/Interpretación visual de bandas existentes en el gel.

Tipo de Proteinuria	Bandas Observadas en el Gel	Proteínas halladas
Orina normal Glomerular	Banda de albúmina pequeña Albúmina, alfa-1, beta, gamma	albúmina albúmina, alfa-1 antitripsina, transferina, gammaglobulinas
Tubular	alfa-1, alfa-2, beta	Proteínas ligadas al retinol beta-2 microglobulina, alfa2-microglobulina
Exceso	gamma o variable	inmunoglobulinas, cadenas ligeras sueltas.

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. Banda en el borde catódico de la región gamma que no muestra reactividad con antisueños de inmunofijación

C Pueden detectarse proteínas reactivas (CRP) en pacientes con respuestas inflamatorias agudas^{7A}. Las CRP aparecen como una banda estrecha en el borde catódico del modelo de proteína de suero. Altos niveles de Antitripsina-Alfa 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.

3. Falta de reactividad con antisueños 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 antisueños, 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) antisueños 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 una serie de muestras y se compararon con otras disponibles en el mercado. Ambos kits mostraron resultados equivalentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fauchier, P. y Catalan, F. 'Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis' Alfred Fournier Institute, París, Francia, 1988.
2. Killingsworth, L.M., Cooney, S.K. y Tyllia, M.M. 'Finding Clues to Disease in Urine' Diagnostic Medicine, 1980 ; mayo/junio : 69-75.
3. Umbreit, A. y 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. y 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. y Lockhart, S. 'A Comparison of Three Procedures for the Detection of Bence-Jones Proteinuria' Ann. Clin. Biochem., 1997, 34 : 371-374.
6. Alfonso, E., 'Quantitation Immunoelectrophoresis of Serum Proteins', Clin. Chim. Acta., 1964; 10 : 114-122.
7. Alper, C.A y Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox. 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, Nueva York.
9. Johnson, A.M., 'Genetic Typing of Alpha(1)-Antitrypsin in Immunofixation Electrophoresis. Identification of Subtypes of P.M.', J. Lab. Clin. Med., 1976 ; 87 (1) : 152-163.
10. Cawley, L.P. et al. 'Immunofixation Electrophoretic Technique Applied to Identification of Proteins in Serum and Cerebrospinal Fluid', Clin. Sang., 1976; 22 : 1262-1268.
11. Ritchie, R.F and Smith, R. 'Immunofixation III, Application to the Study of Monoclonal Proteins', Clin. Sang., 1976; 22 : 1982-1985.