

SAS-I Urine Analysis

Instructions For Use REF 200400

**SAS-I Analyse d'urine
Fiche technique**

**SAS-I Urinanalyse
Anleitung**

**SAS-I Analisi delle urine
Istruzioni per l'uso**

**SAS-I Análisis de orina
Instrucciones de uso**

Contents

English	1
Français	9
Deutsch	17
Italiano	25
Español	34



INTENDED PURPOSE

The SAS-I Urine Analysis Kit is intended for the screening of unconcentrated urine samples by agarose gel electrophoresis.

Urinary proteins are derived primarily from plasma proteins that filter through the kidney. The appearance of abnormal plasma proteins in the urine is of great value in evaluating renal function. The appropriate study of proteinuria should include quantitative and qualitative assessment of the type and amount of proteins excreted^{1,5}. The combination of electrophoretic separation of urine proteins, coupled to the identification of specific protein types by immunoprecipitation allows the differentiation of several types of proteinuria - Physiological, Glomerular (selective and non-selective), Tubular and proteinuria associated with Dysglobulinaemias^{1,5}. The SAS-I Urine Analysis kit separates urine proteins according to charge in an agarose gel. The proteins are then stained to allow visualisation and quantitative or qualitative interpretation. The high sensitivity stain used in the kit allows most urine samples to be tested without prior concentration, and the use of the Urine Protein Internal Standard allows an approximation of urine total protein, or individual band protein concentrations to be determined by densitometry.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

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

COMPOSITION**1. SAS-I Urine Analysis Gel**

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

2. Acid Violet Stain Concentrate

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

3. Destain Solution Concentrate

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

4. Wash Solution

Contains concentrated Wash Solution. Dilute the contents of the bottle to 2 litres with saline solution.

5. Other Kit Components

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

STORAGE AND SHELF-LIFE**1. SAS-I Urine Analysis Gel**

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

2. Acid Violet Stain

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

3. Destain Solution

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

4. Wash Solution

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

ITEMS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

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

Cat. No. 210100 Disposable sample cups (100)

Cat. No. 5014 Development Weight

Cat. No. 3100 REP Prep

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

Fixative Solution: Mix 500ml methanol with 500ml purified water. Store in a tightly stoppered bottle.

Saline solution (0.85% NaCl)

Purified water

The following items are not required for standard urine analysis but may be required for further investigation:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cat. No. 9249 Antiserum to Human IgD

Cat. No. 9250 Antiserum to Human IgE

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 should initially be used without concentration or dilution, unless the total protein is known to exceed 1000mg/L. If scanning the completed gel by densitometry, an indication of the Urine Total Protein, or the concentration of individual protein zones can be performed by the incorporation of the Urine Protein Internal Standard (Cat. No. 3032) into the sample preparation procedure. Full Instructions For Use are provided with each Urine Protein Internal Standard.

STEP-BY-STEP PROCEDURE

1. Pipette 35µl of the sample into the appropriate well of the SAS-I sample tray or disposable sample cups.
 - i) **SAS-I & SAS-I Plus users:** Carefully place the sample tray onto the applicator drawer. Ensure that the tray is pushed firmly down into position.
 - ii) **SAS-3 users:** Carefully locate the sample tray using the sample base locating pins. Ensure that the tray is positioned securely.
2. Remove the gel from the packaging and:
 - i) **SAS-I users:** place the gel in the SAS-I, agarose side up, aligning the positive and negative sides with the corresponding electrode posts.
 - ii) **SAS-I Plus users:** dispense 400µL of REP Prep onto the heat sink. Place the gel onto the heat sink, agarose side up, aligning the positive and negative sides with the corresponding electrode posts, taking care to avoid air bubbles under the gel.
 - iii) **SAS-3 users:** place the alignment guide onto the pins and dispense 400µL of REP Prep onto the centre of the chamber. Place the gel into the chamber agarose side up, using the guide, align the positive and negative sides with the corresponding electrode posts, taking care to avoid air bubbles under the gel.
3. Blot the surface of the gel with a blotter C, discard the blotter.
4.
 - i) **SAS-I users:** attach the electrodes onto the top side of the electrode posts so that they are in contact with the gel blocks.
 - ii) **SAS-I Plus users:** (as above). Place the cover over the gel and electrodes and press firmly for 5 seconds to ensure contact.
 - iii) **SAS-3 users:** attach the electrodes onto the the electrode posts so that they are in contact with the gel blocks.
5. Place two applicator blade assemblies in position on the instrument, (**SAS-3 users:** slot A and I0).
6. Perform the Urine Analysis electrophoresis:

- i) **SAS-I users:**
 Urine Analysis: (with internal standard, cat. no. 3032) 100 volts, 16 mins, 10 applications
 Urine Analysis: (without internal standard, cat. no. 3032) 100 volts, 17 mins, 10 applications
 Immunofixation: 80 volts, 17 mins, 10 applications
- ii) **SAS-I Plus users:**
 Urine Analysis: (with internal standard, cat. no. 3032) 100 volts, 20 mins, 20°C, 10 applications
 Urine Analysis: (without internal standard, cat. no. 3032) 100 volts, 21 mins, 20°C, 10 applications
 Immunofixation: 80 volts, 20 mins, 20°C, 10 applications
- iii) **SAS-3 users:**

Step	Time (mm:ss)	Temperature (°C)	Voltage	Other
Load Sample	00:10	21		Speed 1
Apply Sample	00:10	21		Speed 1* ¹
Repeat steps 'load sample, apply sample' for a total of 10 applications.				
Electrophoresis	18:00	20	100	
Dry	08:00	54* ²		

*¹ Use Location 2

*² Do not include dry step if immunofixation is required.

NOTE: For Urine Analysis, remove buffer blocks prior to drying.

7. Following electrophoresis, (**SAS-I Plus users:** remove the cover), remove the electrodes from the surface of the gel. **NOTE:** Gels can be stained to show all proteins present in the sample (see staining protocol), or the gels can be incubated with specific antisera to show particular proteins of interest (see immunofixation protocol).

STAINING PROTOCOL

8. **SAS-I and SAS-I Plus users:** Remove both gel blocks using the Gel Block Remover.
 9. Attach the gel to the staining chamber holder.
 10. Select the Urine test program on the staining unit and, following the prompts, Fix, Stain, Destain, Wash, and Dry the gel.
- a) **SAS-2 (Auto-Stainer)**

Step	Solution	Time (mm:ss)	Port	Temperature (°C)
Fix	Fixative solution	05:00	4	
Dry	—	15:00		65
Stain	Acid Violet Stain	10:00	5	
Wash	Purified water	00:10	1	
Wash	Purified water	00:10	1	
Destain	Destain solution	02:00	2	
Destain	Destain solution	02:00	2	
Wash	Water	01:00	1	
Dry	—	15:00		65

- b) **SAS-4 (Auto-Stainer)**

Step	Time (mm:ss)	Temperature (°C)	Other
Stain	04:00		Recirculate ON
Destain	02:00		Recirculate ON
Destain	02:00		Recirculate ON
Dry	12:00	64	

- c) **Manual**

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

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

IMMUNOFIXATION PROTOCOL

8. Program the following parameters into the instrument.
- i) **SAS-I Plus users:** Incubation step 1: 10 mins, 37°C (incubate)
 Incubation step 2: 8 mins, 40°C (D blot)
- ii) **SAS-3 users:**

Step	Time (mm:ss)	Temperature (°C)
Apply antisera	10:00	21
Insert combs	02:00	21
Blotter D	05:00	40
Dry	08:00	54

9. **(SAS-3 users: remove the alignment guide).** Position the antiserum application template onto the gel surface. **NOTE:** The milled antisera channels should be aligned centrally over the printed box on the gel in which the samples are applied.
10. Apply 2 drops (or 50µl) of the appropriate antiserum / fixative into the hole of the immunoglobulin lanes. Ensure that the antisera has completely filled the channels.
11. **SAS-I users:** Incubate the gel: 15...30°C, 10 minutes.
SAS-I Plus users: Incubate the gel.
12. Following incubation, place a blotter comb into the holes of the antiserum template. Allow 2 minutes for the excess antisera to be absorbed, then remove the blotter combs and the template from the gel surface.
13. **i) SAS-I users:** Remove the gel blocks using the Gel Block Remover and wash the gel in wash solution for 5 minutes.
ii) SAS-I Plus and SAS-3 users: Place a blotter D (smooth side down) onto the surface of the gel, leave for 10 seconds and remove.
14. **i) SAS-I users:** Place the gel on a blotter D agarose side up and place a blotter B (wetted in wash solution) onto the surface of the gel followed by two blotter X. Press the gel using the Development Weight for 10 minutes.
ii) SAS-I Plus and SAS-3 users: Place a blotter D (smooth side down) onto the surface of the gel and replace the antiserum template to hold the blotter flat. Blot the gel.
15. **i) SAS-I users:** Remove the blotters and place the gel in wash solution for 4 minutes with gentle agitation.
ii) SAS-I Plus users: Remove the blotter D.
iii) SAS-3 users: Remove the blotter D and dry the gel.
16. **i) SAS-I users:** Remove the gel from the wash solution and place on a blotter D agarose side up. Place a blotter B (wetted in wash solution) onto the surface of the gel followed by a blotter D. Press the gel for 3 minutes.
ii) SAS-I Plus and SAS-3 users: Remove the gel blocks using the Gel Block Remover. Go to Step 18.
17. **i) SAS-I users:** Remove the blotters.
18. Attach the gel to the staining chamber holder.
NOTE: Immediately after use, clean the antisera template with a mild, biocidal detergent. If possible, scrub the bottom of the template with a toothbrush or small test tube brush. Do not let the antisera dry on the template. Build up of antisera on the surface of the template will result in the formation of bubbles during the antisera application step. Dry the antisera template thoroughly. Water left in the holes will hinder the application of antisera for the next use. Store the template upside down to increase the air circulation and thus the drying potential of the applicator.
19. Select the Urine IFE test program on the staining unit and, following the prompts, Wash, Stain, Destain and Dry the gel.

a) SAS-2 (Auto-Stainer)

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

b) SAS-4 (Auto-Stainer)

Step	Time (mm:ss)	Temperature (°C)	Other
Wash	00:03		Recirculate ON
Wash	10:00		Recirculate ON
Stain	04:00		Recirculate ON
Destain	02:00		Recirculate ON
Destain	02:00		Recirculate ON
Dry	12:00	63	

c) Manual

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

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

INTERPRETATION OF RESULTS

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

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

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

Visual interpretation of bands present on the gel by immunofixation:

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, beta2-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^{6,7}. 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.

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 b-2-mercaptoethanol to 'reveal' the light chains.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

a) Reproducibility

Band	Within-Run (n=24)		Between-Run (n=4)	
	Mean (%)	CV (%)	Mean	CV (%)
Band 1	54.9	2.7	53.6	3.0
Band 2	5.0	8.3	5.2	9.5
Band 3	8.9	9.1	9.3	9.2
Band 4	9.7	7.3	9.8	7.5
Band 5	6.8	8.9	7.1	10.4
Band 6	14.6	6.8	12.6	6.9

b) **Sensitivity:** 50ng per band (equivalent to 10mg/L in the sample), determined as the lowest concentration of protein which was evident as a discrete band on the completed gel.

c) **Linearity** Linearity is a function of densitometer specification as well as gel performance. It is recommended that each customer determine the linearity of the method based upon the densitometer in use in the laboratory.

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. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox. Sang., 1969; 17 : 445-452.
7. 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.
8. Microprotein - PR™ (Procedure No. 611) Sigma Diagnostics, September 1995.

UTILISATION

Le kit SAS-I Analyse d'urine est utilisé pour le screening d'échantillons d'urine non concentrée par électrophorèse en gel d'agarose.

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 d'une protéinurie doit inclure l'évaluation qualitative et quantitative du type et de la quantité de protéines excrétées^{1,5}. 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 dysglobulinémie^{1,5}. Le kit SAS-I Analyse d'urine sépare les protéines urinaires en fonction de leur charge en gel d'agarose.

Les protéines sont ensuite colorées afin de permettre une interprétation qualitative et quantitative. La haute sensibilité du colorant utilisé permet de tester la plupart des échantillons urinaires sans concentration préalable; de plus, l'utilisation du standard interne Protéines urinaires permet une approximation de la protéinurie ou de la concentration des bandes par densitométrie.

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-I Analyse d'urine

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

2. Colorant violet acide concentré

Contient du colorant violet 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.

3. Solution décolorante

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

4. Solution de lavage

Contient la solution de lavage concentrée. Diluer le contenu du flacon dans 2 litres de solution physiologique.

5. Autres composants du kit

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

STOCKAGE ET CONSERVATION

1. Plaque SAS-I Analyse d'urine

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. Colorant violet 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.

3. 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.

4. Solution de lavage

La solution de lavage concentrée doit être conservée entre 15...30°C; elle est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Une fois reconstituée, elle est stable 6 mois entre 15...30°C. Un aspect floconneux indique une détérioration de la solution de lavage.

MATÉRIELS NÉCESSAIRES NON FOURNIS

Réf. 210200 Applicateurs échantillons (1 x 10)

Réf. 210300 Applicateurs échantillons (5 x 10)

Réf. 210100 Cupules échantillons jetables (100)

Réf. 5014 Poids à développement

Réf. 3100 Solution de REP-prep

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

Solution fixative: Mélanger 500ml de méthanol avec 500ml d'eau distillée. Conserver en bouteille hermétiquement fermée.

Solution physiologique (0,85% NaCl)

Eau distillée

Les produits suivants ne sont pas nécessaires pour une analyse d'urine standard, mais ils peuvent l'être pour des investigations supplémentaires:

Réf. 220100 Antisérum humain, protéines urinaires totales (2ml)

Réf. 220200 Antisérum humain, micro-protéines urinaires (2ml)

Réf. 220300 Antisérum humain, macro-protéines urinaires (2ml)

Réf. 220400 Antisérum humain, protéines GAM (2ml)

Réf. 220700 Antisérum humain, chaîne légère kappa libre et liée (2ml)

Réf. 220800 Antisérum humain, chaîne légère lambda libre et liée (2ml)

Réf. 220500 Antisérum humain, chaîne légère libre kappa (2ml)

Réf. 220600 Antisérum humain, chaîne légère libre lambda (2ml)

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

Réf. 221000 Antisérum anti pentavalent de l'urine humaine (2ml)

Réf. 9249 Antisérum anti IgD humaine

Réf. 9250 Antisérum anti IgE humaine

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 peuvent être utilisés sans concentration ou dilution, jusqu'à une protéinurie n'excédant pas 1000mg/l. Si une lecture du gel est réalisée à l'aide d'un densitomètre, il est possible de déterminer la protéinurie ou la concentration des bandes protéiques spécifiques en incorporant le standard interne Protéine urinaires (réf. 3032) à chaque échantillon. Se référer à la procédure jointe à chaque flacon de standard interne Protéines urinaires.

MÉTHODOLOGIE

1. Pipeter 35µl d'échantillon dans les puits correspondants du porte-échantillon du SAS-I ou dans les cupules échantillons jetables.
 - i) **Pour les utilisateurs SAS-1 et SAS-1 Plus:** Placer avec précaution le porte-échantillon sur le chariot applicateur. S'assurer qu'il est solidement mis en place.
 - ii) **Pour les utilisateurs SAS-3:** Mettre en place le porte-échantillon avec précaution à l'aide des ergots de guidage de l'embase. S'assurer qu'il est solidement mis en place.
2. Sortir le gel de son emballage puis:
 - i) **Pour les utilisateurs SAS-1:** Placer le gel dans le SAS-I, agarose vers le haut, en respectant les polarités.
 - ii) **Pour les utilisateurs SAS-1 Plus:** Déposer 400µl de REP-prep dans le dissipateur thermique. Placer le gel sur le dissipateur thermique, agarose vers le haut, en respectant les polarités et en veillant à ce qu'il n'y ait pas de bulles d'air sous le gel.
 - iii) **Pour les utilisateurs SAS-3:** Placer le guide d'alignement sur les picots et déposer 400µl de REP-prep au centre de la chambre. Placer le gel dans la chambre, agarose vers le haut, en respectant les polarités et en veillant à ce qu'il n'y ait pas de bulles d'air sous le gel.
3. Sécher la surface du gel à l'aide d'un buvard C, jeter le buvard.
4.
 - i) **Pour les utilisateurs SAS-1:** Fixer les électrodes sur la partie supérieure des plots que sorte qu'elles soient en contact avec les ponts d'agarose.
 - ii) **Pour les utilisateurs SAS-1 Plus:** (même chose que ci-dessus). Mettre le couvercle sur le gel et les électrodes et faire pression 5 secondes pour assurer un bon contact.
 - iii) **Pour les utilisateurs SAS-3:** Fixer les électrodes sur les plots que sorte qu'elles soient en contact avec les ponts d'agarose.
5. Mettre en place deux applicateurs dans l'instrument (**Pour les utilisateurs SAS-3:** encoches A et I0).
6. Faire migrer:
 - i) **Pour les utilisateurs SAS-1:**
 Analyse d'urine: (avec la norme interne, Réf. 3032) 100 volts, 16 min., 10 dépôts.
 Analyse d'urine: (sans norme interne, Réf. 3032) 100 volts, 17 min., 10 dépôts.
 Immunofixation: 80 volts, 17 min., 10 dépôts.
 - ii) **Pour les utilisateurs SAS-1 Plus:**
 Analyse d'urine: (avec la norme interne, Réf. 3032) 100 volts, 20 min., 20°C, 10 dépôts.
 Analyse d'urine: (sans norme interne, Réf. 3032) 100 volts, 21 min., 20°C, 10 dépôts.
 Immunofixation: 80 volts, 20 min., 20°C, 10 dépôts.

iii) Pour les utilisateurs SAS-3:

Étape	Durée (mm:ss)	Température (°C)	Tension	Autre
Charger échantillon	00:10	21		Vitesse I
Déposer échantillon	00:10	21		Vitesse I* ¹
Répétez les étapes Charger échantillon, Déposer échantillon pour un total de 10 dépôts.				
Électrophorèse	18:00	20	100	
Sécher	08:00	54°C* ²		

*¹ Utiliser Emplacement 2 (Loc 2)

*² Ne pas inclure l'étape Sécher si l'immunofixation est nécessaire.

REMARQUE: Pour ce test, enlever les ponts d'agarose avant de procéder au séchage.

- Une fois la migration terminée, **(Pour les utilisateurs SAS-I Plus:** enlever le couvercle), enlever les électrodes de la surface du gel. **REMARQUE:** Il est alors possible de colorer les gels afin de mettre en évidence toutes les protéines présentes dans l'échantillon (cf. protocole de coloration) ou bien de les incuber avec des antisérums spécifiques afin de mettre en évidence certaines protéines (cf. protocole d'immunofixation).

PROTOCOLE DE COLORATION

- Pour les utilisateurs SAS-I et SAS-I Plus:** Enlever les deux ponts d'agarose à l'aide la raclette.
- Fixer le gel sur le support de la chambre de coloration.
- Sélectionner le programme Analyse d'urine du module de coloration puis, en suivant les messages, fixer, colorer, décolorer, laver et sécher le gel.

a) SAS-2 (module de coloration)

Étape	Solution	Durée (mm:ss)	Orifice	Température (°C)
Fixer	Solution fixative	05:00	4	
Sécher	—	15:00		65
Colorer	Colorant violet acide	10:00	5	
Laver	Eau distillée	00:10	1	
Laver	Eau distillée	00:10	1	
Décolorer	Solution décolorante	02:00	2	
Décolorer	Solution décolorante	02:00	2	
Laver	Eau	01:00	1	
Sécher	—	15:00		65

b) SAS-4 (module de coloration)

Étape	Durée (mm:ss)	Température (°C)	Autre
Colorer	04:00		Rec ON
Décolorer	02:00		Rec ON
Décolorer	02:00		Rec ON
Sécher	12:00	64	

c) Manuel

Suivre la séquence indiquée pour le SAS-2, en utilisant des bains de solution fixative, de colorant, de décolorant et d'eau distillée. Sécher dans une étuve ventilée entre 60...70°C.

11. Une fois le cycle de coloration terminé, enlever le gel de la chambre de coloration. Il est alors prêt pour être examiné.

Protocole d'immunofixation

8. Régler les paramètres suivants sur l'instrument.

i) Pour les utilisateurs SAS-I Plus:

Incubation étape 1: 10 min., 37°C (incuber)

Incubation étape 2: 8 min., 40°C (buvard D)

ii) Pour les utilisateurs SAS-3:

Étape	Durée (mm:ss)	Température (°C)
Déposer antisérums	10:00	21
Insérer peignes	02:00	21
Buvard D	05:00	40
Sécher	08:00	54

9. **(Pour les utilisateurs SAS-3:** Enlever le guide d'alignement). Placer le masque applicateur antisérum sur la surface du gel. **REMARQUE:** Les cases antisérums du masque doivent s'aligner sur le centre de la case imprimée du gel sur lequel les échantillons sont déposés.
10. Déposer 2 gouttes (ou 50µl) de l'antisérum approprié ou de solution fixative dans l'orifice des cases d'immunoglobulines. Vérifier que les antisérums remplissent complètement les canaux.
11. **Pour les utilisateurs SAS-I:** Incuber le gel entre 15...30°C pendant 10 minutes.
Pour les utilisateurs SAS-I Plus: Incuber le gel.
12. Une fois l'incubation terminée, placer un peigne sur les orifices du masque applicateur. Attendre 2 minutes que l'antisérum en excès soit absorbé puis retirer les peignes et le masque de la surface du gel.
13. **i) Pour les utilisateurs SAS-I:** Enlever les ponts d'agarose à l'aide de la raclette et laver le gel dans la solution de lavage pendant 5 minutes.
ii) Pour les utilisateurs SAS-I Plus et SAS-3: Placer un buvard D (côté lisse vers la bas) sur la surface du gel, attendre 10 secondes et l'enlever.
14. **i) Pour les utilisateurs SAS-I:** Placer le gel, agarose vers le haut, sur un buvard D et déposer dessus un buvard B (imbibé de solution de lavage) puis deux buvards X. Presser le gel à l'aide d'un poids à développement pendant 10 minutes.
ii) Pour les utilisateurs SAS-I Plus et SAS-3: Placer un buvard D (côté lisse vers le bas) sur la surface du gel et replacer le masque antisérums sur le buvard afin de bien le maintenir à plat. Sécher le gel à l'aide du buvard.
15. **i) Pour les utilisateurs SAS-I:** Retirer les buvards et placer le gel dans un bain de solution de lavage sous agitation douce pendant 4 minutes.
ii) Pour les utilisateurs SAS-I Plus: Enlever le buvard D.
iii) Pour les utilisateurs SAS-3: Enlever le buvard D et sécher le gel.
16. **i) Pour les utilisateurs SAS-I:** Enlever le gel de la solution de lavage et le placer, agarose vers le haut, sur un buvard D. Déposer dessus un buvard B (imbibé de solution de lavage) puis un buvard D. Presser le gel pendant 3 minutes.
ii) Pour les utilisateurs SAS-I Plus et SAS-3: Enlever les ponts d'agarose à l'aide la raclette. Passer à l'étape 18.

17. **i) Pour les utilisateurs SAS-1:** Enlever les buvards.
 18. Fixer le gel sur le support de la chambre de coloration.

REMARQUE: Immédiatement après utilisation, nettoyer le masque applicateur antisérums avec une solution détergente douce et biocide. Si possible, frotter l'extrémité inférieure du masque avec une brosse à dents ou une petite brosse pour tubes à essais. Ne pas laisser l'antisérum sécher sur le masque. L'accumulation d'antisérum sur la surface du masque entraînerait la formation de bulles lors de l'injection des antisérums. Sécher complètement le masque applicateur. Si de l'eau reste dans les orifices, elle empêchera une application correcte des antisérums lors de l'utilisation suivante. Garder le masque à l'envers de façon à laisser circuler l'air.

19. Sélectionner le programme IFE d'urine du module de coloration puis, en suivant les messages, laver, colorer, décolorer et sécher le gel.

a) SAS-2 (module de coloration)

Étape	Solution	Durée (mm:ss)	Orifice	Température (°C)
Sécher	—	10:00		55
Laver	Solution de lavage	07:00	4	
Colorer	Colorant violet acide	03:00	5	
Décolorer	Solution décolorante	02:00	2	
Sécher	—	05:00		65
Laver	Solution de lavage	03:00	4	
Laver	Solution de lavage	03:00	4	
Sécher	—	05:00		65

b) SAS-4 (module de coloration)

Étape	Durée (mm:ss)	Température (°C)	Autre
Laver	00:03		Rec ON
Laver	10:00		Rec ON
Colorer	04:00		Rec ON
Décolorer	02:00		Rec ON
Décolorer	02:00		Rec ON
Sécher	12:00	63	

c) Manuel

Suivre la séquence indiquée pour le SAS-2, en utilisant des bains de solution de lavage, de colorant et de décolorant. Sécher dans une étuve ventilée entre 60...70°C.

20. Une fois le cycle de coloration terminé, enlever le gel de la chambre de coloration. Il est alors prêt pour être examiné.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

La plupart des protéines monoclonales migrent du côté cathodique, c'est à dire la zone gamma du protéinogramme, mais, en raison de leur caractère anormal, il est possible qu'elles migrent ailleurs dans la zone des globulines. La bande monoclonale du 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.

Interprétation visuelle des bandes présentes sur le gel traité par immunofixation:

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, bêta-2 microglobuline, alpha-2 microglobuline
Surcharge	Gamma ou autres	Immunoglobulines, 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^{6,7}. 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) utilisez 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

a) Reproductibilité

Bande	Intra-plaque (n=24)		Inter-plaque (n=4)	
	Moyenne (%)	CV (%)	Moyenne (%)	CV (%)
Bande 1	54,9	2,7	53,6	3,0
Bande 2	5,0	8,3	5,2	9,5
Bande 3	8,9	9,1	9,3	9,2
Bande 4	9,7	7,3	9,8	7,5
Bande 5	6,8	8,9	7,1	10,4
Bande 6	14,6	6,8	12,6	6,9

b) Sensibilité

Sensibilité de 25ng par bande (équivalent à 10mg/l dans l'échantillon), déterminée comme la concentration la plus faible en protéine qui permet de mettre en évidence une fine bande après coloration.

c) Linéarité

La linéarité est fonction du densitomètre ainsi que des performances du gel. Il est recommandé à chaque client de déterminer la linéarité de cette méthode en fonction du densitomètre utilisé au sein du laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Fauchier, P. et Catalan, F. 'Interpretive Guide to Clinical Electrophoresis', Institut Alfred Fournier, 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. Alper, C. A et Johnson, A. M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox. Sang., 1969 ; 17 : 445-452.
7. 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.
8. Microprotein-PR™ (procédure n° 611) Sigma Diagnostics, septembre 1995.

ANWENDUNGSBEREICH

Das SAS-I Urinanalyse-Kit dient zur Untersuchung nicht konzentrierter Urinproben durch Elektrophorese im Agarose-Gel.

Proteine im Urin stammen hauptsächlich von durch die Niere gefilterten Plasmaproteinen ab. Das Vorkommen abnormaler Plasmaproteine im Urin ist bei der Beurteilung der Nierenfunktion von großer Bedeutung. Die sachgerechte Untersuchung einer Proteinurie sollte quantitative und qualitative Beurteilung von Typ und Menge der ausgeschiedenen Proteine umfassen¹⁻⁵. Die elektrophoretische Auftrennung von Plasmaproteinen gekoppelt mit einer Identifizierung der spezifischen Proteintypen durch Immunpräzipitation ermöglicht die Differenzierung verschiedener Proteinurie-Typen – physiologisch, glomerulär (selektiv und unselektiv), tubulär und Proteinurie verbunden mit Dysglobulinämien¹⁻⁵. Das SAS-I Urinanalyse-Kit trennt Proteine im Urin nach ihrer Ladung im Agarose-Gel auf.

Anschließend werden die Proteinbanden durch Färbung sichtbar gemacht und können quantitativ oder qualitativ ausgewertet werden. Der im Kit eingesetzte hochempfindliche Farbstoff ermöglicht das Testen der meisten Urinproben ohne vorherige Konzentrierung, und die Benutzung des interner Urin-Protein-Standard ermöglicht eine Abschätzung des Gesamteiweiß im Urin oder Konzentration einzelner Proteinbanden durch Densitometrie.

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-I Gel für die Urinanalyse**

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

2. „Saures-Violett“ Farbstoffkonzentrat

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

3. Entfärbelösung-Konzentrat

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

4. Waschlösung

Enthält konzentrierte Waschlösung. Den Inhalt der Flasche auf 2 Liter mit Kochsalz verdünnen.

5. Weitere Kit-Komponenten

Jedes Kit enthält eine Methodenbeschreibung sowie ausreichend Blotter B, C, D, X und Blotterkämme für 10 Gele.

LAGERUNG UND STABILITÄT

1. SAS-I Gel für die Urinanalyse

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. „Saures-Violett“ Farbstoff

Das Farbstoffkonzentrat sollte bei 15...30°C gelagert werden und ist bis zum aufgedruckten Verfallsdatum stabil. Verdünnte Färbelösung ist bei einer Temperatur von 15...30°C für 6 Monate stabil. Es wird empfohlen, den Farbstoff unverzüglich zu entsorgen, um eine Verminderung der Färbungsfähigkeit zu verhindern. Eine schlechte Färbelösung kann auf eine Verschlechterung der Färbelösung hinweisen.

3. Entfärbelösung

Das Entfärbekonzentrat 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.

4. Waschlösung

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

NICHT MITGELIEFERTES, ABER BENÖTIGTES MATERIAL

Kat. Nr. 210200 Probenapplikatorröhrchen (1 x 10)

Kat. Nr. 210300 Probenapplikatorröhrchen (5 x 10)

Kat. Nr. 210100 Einweg-Probengefäße (100)

Kat. Nr. 5014 Entwicklungsgewicht

Kat. Nr. 3100 REP-Prep-Lösung

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

Fixierlösung: 500ml Methanol mit 500ml dest. Wasser mischen. In einer fest verschlossenen Flasche aufbewahren.

Kochsalzlösung (0,85% NaCl)

Dest. Wasser

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

Kat. Nr. 220100 Antihumanserum Gesamteiweiß im Urin (2ml)

Kat. Nr. 220200 Antihumanserum Mikroproteine im Urin (2ml)

Kat. Nr. 220300 Antihumanserum Makroproteine im Urin (2ml)

Kat. Nr. 220400 Antihumanserum GAM Proteine (2ml)

Kat. Nr. 220700 Antihumanserum freie & gebundene kappa-light-Kette (2ml)

Kat. Nr. 220800 Antihumanserum freie & gebundene lambda-light-Kette (2ml)

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

Kat. Nr. 220600 Antihumanserum freie lambda-light-Kette (2ml)

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

Kat. Nr. 221000 Antihumanserum Pentavalent im Urin (2ml)

Kat. Nr. 9249 Antihumanserum IgD

Kat. Nr. 9250 Antihumanserum IgE

PROBENENTNAHME UND VORBEREITUNG

Frischer Urin ist das Untersuchungsmaterial der Wahl. Proben können gekühlt bei 2...6°C bis zu 72 Stunden oder bei -20°C 2 Wochen gelagert werden. Proben zunächst unverdünnt oder unkonzentriert einsetzen, es sei denn, das Gesamtprotein ist über 1000mg/l. Beim densitometrischen Scannen der fertigen Gele kann ein Hinweis auf das Gesamtprotein im Urin oder die Konzentration der einzelnen Proteinenzonen durch Einsetzen des internen Proteinstandards im Urin (Kat. Nr. 3032) bei der Probenvorbereitung erzielt werden. Ausführliche Arbeitsanleitung wird mit jedem „Urine Protein Internal Standard“ mitgeliefert.

SCHRITT-FÜR-SCHRITT METHODE

1. 35µl Probe in die entsprechende Vertiefung der SAS-I Probenplatte oder der Einweg-Probengefäße pipettieren.
 - i) **Nur für SAS-I & SAS-I Plus:** Die Probenplatte vorsichtig auf den Applikatoreinschub stellen. Darauf achten, dass die Platte fest in Position eingerastet ist.
 - ii) **Nur für SAS-3:** Mit den Haltestiften der Probenbasis die Probenplatte vorsichtig einrichten. Sicherstellen, dass die Platte richtig eingesetzt ist.
2. Das Gel aus der Verpackung nehmen und:
 - i) **Nur für SAS-I:** Gel in das SAS-I (Agarose nach oben) legen. Die positiven und negativen Seiten auf die passenden Elektrodenhalter ausrichten.
 - ii) **Nur für SAS-I Plus:** 400µL REP-Prep-Lösung auf das Kühlblech verteilen. Das Gel mit der Agaroseseite nach oben auf die Kühlplatte legen, die positive und negative Seite an den passenden Elektrodenhaltern ausrichten. Darauf achten, dass unter dem Gel keine Luftblasen sind.
 - iii) **Nur für SAS-3:** Die Führungsschiene auf die Stifte setzen und 400µl REP-Prep auf die Kammermitte verteilen. Das Gel mit der Agaroseseite nach oben in die Kammer legen und mit Hilfe der Schiene die positive und negative Seite an den passenden Elektrodenhaltern ausrichten. Darauf achten, dass unter dem Gel keine Luftblasen sind.
3. Die Geloberfläche mit einem Blotter C blotten, Blotter verwerfen.
4.
 - i) **Nur für SAS-I:** Die Elektroden oben auf den Elektrodenhaltern befestigen, damit sie mit den Gelblöcken in Kontakt sind.
 - ii) **Nur für SAS-I Plus:** (wie oben). Die Abdeckung über Gel und Elektroden geben und für einen guten Kontakt 5 Sekunden lang fest aufdrücken.
 - iii) **Nur für SAS-3:** Die Elektroden auf den Elektrodenhaltern befestigen, damit sie mit den Gelblöcken in Kontakt stehen.
5. Zwei Applikator-kamm-Halterungen in Position auf dem Gerät anbringen, (**Nur für SAS-3:** Schlitz A und I0).

6. Die Urinanalyse-Elektrophorese durchführen:

i) **Nur für SAS-1:**

Urinanalyse: (mit internem Standard, Kat. Nr. 3032) 100 Volt, 16 Min., 10 Applikationen

Urinanalyse: (ohne internen Standard, Kat. Nr. 3032) 100 Volt, 17 Min., 10 Applikationen

Immunofixation: 80 Volt, 17 Min., 10 Applikationen

ii) **Nur für SAS-1 Plus:**

Urinanalyse: (mit internem Standard, Kat. Nr. 3032) 100 Volt, 20 Min., 20°C, 10 Applikationen

Urinanalyse: (ohne internen Standard, Kat. Nr. 3032) 100 Volt, 21 Min., 20°C, 10 Applikationen

Immunofixation: 80 Volt, 20 Min., 20°C, 10 Applikationen

iii) **Nur für SAS-3:**

Schritt	Dauer (mm:ss)	Temperatur (°C)	Spannung	Andere
Probenaufnahme	00:10	21		Geschwindigkeit I
Probenapplikation	00:10	21		Geschwindigkeit I* ¹
Die Schritte 'Probenaufnahme, Probenapplikation' für insgesamt 10 Applikationen wiederholen.				
Elektrophorese	18:00	20	100	
Trocknen	08:00	54* ²		

*¹ Platz 2 verwenden

*² Für Immunfixation den Schritt „Trocknen“ auslassen.

BITTE BEACHTEN: Bei der Urinanalyse die Pufferblöcke vor dem Trocknen entfernen.

7. Nach der Elektrophorese, (**Nur für SAS-1 Plus:** Abdeckung entfernen), die Elektroden von der Geloberfläche entfernen. **BITTE BEACHTEN:** Gele können entweder zum Nachweis aller Proteine der Probe gefärbt (siehe Färbanleitung) oder sie können mit spezifischen Antisera inkubiert werden, um nur bestimmte Proteine aufzuzeigen (siehe Anleitung zur Immunfixation).

FÄRBEANLEITUNG

8. **Nur für SAS-1 und SAS-1 Plus:** Beide Gel-Blöcke mit dem Gelblock-Entferner entfernen.

9. Das Gel an der Halterung der Färbekammer befestigen.

10. Am Färbegerät Testprogramm „Urin“ auswählen und, den Eingabeaufforderungen folgend, das Gel fixieren, färben, entfärben, waschen und trocknen.

a) **SAS-2 (Auto-Stainer)**

Schritt	Lösung	Dauer (mm:ss)	Anschluss	Temperatur (°C)
Fixieren	Fixierlösung	05:00	4	
Trocknen	—	15:00		65
Färben	„Saures Violett“ Farbstoff	10:00	5	
Waschen	Destilliertes Wasser	00:10	1	
Waschen	Destilliertes Wasser	00:10	1	
Entfärben	Entfärbelösung	02:00	2	
Entfärben	Entfärbelösung	02:00	2	
Waschen	Wasser	01:00	1	
Trocknen	—	15:00		65

b) SAS-4 (Auto-Stainer)

Schritt	Dauer (mm:ss)	Temperatur (°C)	Andere
Färben	04:00		Umlauf EIN
Entfärben	02:00		Umlauf EIN
Entfärben	02:00		Umlauf EIN
Trocknen	12:00	64	

c) Manuell

Dem für den SAS-2 Auto-Stainer angegebenen Ablauf folgen. Zum Fixieren, Färben, Entfärben und Waschen ein Färbebad, und zum Trocknen einen Trockenschrank mit Umluft und einer Temperatur von 60...70°C verwenden.

11. Am Ende des Färbevorgangs das Gel aus der Färbekammer nehmen. Das Gel kann nun ausgewertet werden.

Protokoll für die Immunfixation

8. Das Gerät mit den folgenden Parametern programmieren.

i) Nur für SAS-I Plus:

Inkubation Schritt 1 10 Min, 37°C (inkubieren)

Inkubation Schritt 2 8 Min., 40°C (D-Blot)

ii) Nur für SAS-3:

Schritt	Dauer (mm:ss)	Temperatur (°C)
Antiseren auftragen	10:00	21
Kämme einstecken	02:00	21
Blotter D	05:00	40
Trocknen	08:00	54

9. (**Nur für SAS-3:** Die Führungsschiene entfernen). Schablone zum Auftragen des Antiserums auf die Geloberfläche positionieren. **BITTE BEACHTEN:** Die gestanzten Rinnen für das Antiserum sollten zentriert über dem beschrifteten Rahmen auf dem Gel ausgerichtet werden, in der die Proben aufgetragen werden.
10. 2 Tropfen (oder 50µl) des entsprechenden Antiserums / Fixativs in die Öffnung der Immunglobulinspuren geben. Sicherstellen, dass die Spuren vollständig mit Antiserum gefüllt sind.
11. **Nur für SAS-I:** Gel inkubieren: 15...30°C, 10 Minuten.
Nur für SAS-I Plus: Gel inkubieren.
12. Nach der Inkubation einen Blotterkamm in die Öffnungen der Antiserumschablone stecken. 2 Minuten lang den Antiseren-Überschuss aufsaugen lassen, dann Blotterkämme und Schablone von der Geloberfläche entfernen.
13. **i) Nur für SAS-I:** Die Gel-Blöcke mit dem Gelblockentferner entfernen. Gel 5 Minuten in Waschlösung waschen.
ii) Nur für SAS-I Plus und SAS-3: Eine Blotter D (mit der glatten Seite nach unten) auf die Geloberfläche legen, nach 10 Sekunden entfernen.
14. **i) Nur für SAS-I:** Das Gel auf mit der Agarose-Seite nach oben auf einen Blotter D legen. Einen Blotter B (mit Waschlösung angefeuchtet) auf die Geloberfläche legen, gefolgt von 2 Blotter X. Das Gel 10 Minuten mit dem Entwicklungsgewicht pressen.
ii) Nur für SAS-I Plus und SAS-3: Blotter D mit der glatten Seite nach unten auf die Geloberfläche legen und zum Flachhalten des Blotters die Antiserum-Schablone wieder auflegen. Gel blotten.

15. **i) Nur für SAS-I:** Die Blotter entfernen und das Gel 4 Minuten unter sanfter Bewegung in Waschlösung waschen.
ii) Nur für SAS-I Plus: Blotter D entfernen.
iii) Nur für SAS-3: Blotter D entfernen und Gel trocknen.
16. **i) Nur für SAS-I:** Das Gel aus der Waschlösung nehmen und mit der Agarose-Seite nach oben auf einen Blotter D legen. Einen Blotter B (in Waschlösung angefeuchtet) auf die Gel-Oberfläche legen, anschließend einen Blotter D. Gel 3 Minuten pressen.
ii) Nur für SAS-I Plus und SAS-3: Die Gel-Blöcke mit dem Gelblock-Entferner entfernen. Weiter mit Schritt 18.
17. **i) Nur für SAS-I:** Blotter entfernen.
18. Das Gel an der Halterung der Färbekammer befestigen.
BITTE BEACHTEN: Sofort nach Gebrauch die Antiserumschablone mit einem milden, bioziden Reinigungsmittel säubern. Nach Möglichkeit die Schablone unten mit einer Zahnbürste oder einer kleinen Reagenzglasbürste reinigen. Antiseren nicht auf der Schablone antrocknen lassen. Ein Ansammeln von Antiserum auf der Schablonenoberfläche würde bei der Applikation von Antiseren zu Bläschenbildung führen. Antiserumschablone gut abtrocknen. Restwasser in den Öffnungen behindert beim nächsten Gebrauch die Antiserum-Applikation. Schablone umgedreht aufbewahren, um die Luftzirkulation und somit das Trocknen des Applikators zu verbessern.
19. Am Färbegerät Testprogramm „Urin IFE“ auswählen und, den Eingabeaufforderungen folgend, das Gel waschen, färben, entfärben und trocknen.

a) SAS-2 (Auto-Stainer)

Schritt	Lösung	Dauer (mm:ss)	Anschluss	Temperatur (°C)
Trocknen	—	10:00		55
Waschen	Waschlösung	07:00	4	
Färben	„Saures Violett“ Farbstoff	03:00	5	
Entfärben	Entfärbelösung	02:00	2	
Trocknen	—	05:00		65
Waschen	Waschlösung	03:00	4	
Waschen	Waschlösung	03:00	4	
Trocknen	—	05:00		65

b) SAS-4 (Auto-Stainer)

Schritt	Dauer (mm:ss)	Temperatur (°C)	Andere
Waschen	00:03		Umlauf EIN
Waschen	10:00		Umlauf EIN
Färben	04:00		Umlauf EIN
Entfärben	02:00		Umlauf EIN
Entfärben	02:00		Umlauf EIN
Trocknen	12:00	63	

c) Manuell

Dem für den SAS-2 Auto-Stainer angegebenen Ablauf folgen. Zum Waschen, Färben und Entfärben ein Färbepad, und zum Trocknen einen Trockenschrank mit Umluft und einer Temperatur von 60...70°C verwenden.

20. Am Ende des Färbevorgangs das Gel aus der Färbekammer nehmen. Das Gel kann nun ausgewertet werden.

AUSWERTUNG 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.

Visuelle Auswertung der auf dem Gel vorhandenen Banden durch Immunfixation:

Art der Proteinurie	Auf dem Gel beobachtete Banden	Anwesende Proteine
Normaler Urin	Kleine Albuminbande	Albumin
Glomerulär	Albumin, Alpha-1, Beta, Gamma	Albumin, Alpha-1 Antitrypsin, Transferrin, Gammaglobuline
Tubulär	Alpha-1, Alpha-2, Beta	Retinol bindendes Protein, Beta2-Mikroglobulin, Alpha-2 Mikroglobulin
Überlauf	Gamma oder Variable	Immunglobuline, freie Leichtketten

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

C-reaktives Protein (CRP) kann bei Patienten mit akuter entzündlicher Reaktion nachgewiesen werden^{6,7}. 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 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

a) Reproduzierbarkeit

Bande	Innerhalb eines Laufs (n=24)		Zwischen den Läufen (n=4)	
	Mittelwert (%)	CV (%)	Mittelwert (%)	CV (%)
Bande 1	54,9	2,7	53,6	3,0
Bande 2	5,0	8,3	5,2	9,5
Bande 3	8,9	9,1	9,3	9,2
Bande 4	9,7	7,3	9,8	7,5
Bande 5	6,8	8,9	7,1	10,4
Bande 6	14,6	6,8	12,6	6,9

b) Empfindlichkeit:

50ng pro Bande (entspricht 10mg/l in der Probe) wurde als niedrigste Proteinkonzentration ermittelt, die als diskrete Bande auf dem fertigen Gel zu erkennen war.

c) Linearität:

Die Linearität ist abhängig von der Densitometer-Spezifikation sowie der Leistung des Gels. Es wird jedem Kunden empfohlen, die Linearität der Methode mit dem im Labor verwendeten Densitometer selbst zu bestimmen.

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. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox. Sang., 1969; 17 : 445-452.
7. 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.
8. Microprotein - PR™ (Procedure No. 611) Sigma Diagnostics, September 1995.

PRINCIPIO

Il kit per l'analisi delle urine SAS-I è stato formulato per lo screening di campioni di urina non concentrati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

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 escrete¹⁵. 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 disglobulinemie¹⁻⁵. Il kit per l'analisi delle urine SAS-I separa le proteine urinarie secondo la loro carica elettrica in un gel di agarosio.

Le proteine vengono quindi colorate per permettere una visualizzazione ed interpretazione quantitativa o qualitativa. Il colorante ad alta sensibilità utilizzato nel kit consente di analizzare la maggior parte dei campioni di urina senza doverli prima concentrare, mentre l'uso dello standard interno per proteine urinarie consente di determinare per densitometria, con una certa approssimazione, le proteine urinarie totali o le singole concentrazioni di proteine nelle bande.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutti i reagenti devono essere utilizzati esclusivamente per diagnostica 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. Gel per l'analisi delle urine SAS-I**

Contiene agarosio in tampone tris / barbital con timerosal e sodio azide come conservante. Il gel è pronto all'uso così come viene fornito.

2. Colorante Acido Viola concentrato

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

3. Soluzione decolorante concentrata

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

4. Soluzione di lavaggio

Contiene soluzione di lavaggio concentrata. Diluire l'intero flacone a 2 litri con soluzione fisiologica.

5. Altri componenti del kit

Ciascun kit contiene un foglio procedurale, blotter B, C, D e X e pettini blotter in quantità sufficiente per completare 10 gel.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

1. Gel per l'analisi delle urine SAS-I

I gel devono essere conservati a 15...30°C e sono stabili 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. Colorante acido viola

Il colorante concentrato deve essere conservato a 15...30°C, è stabile fino a data di scadenza riportata sull'etichetta del flacone. La soluzione decolorante 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.

3. 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.

4. Soluzione di lavaggio

La soluzione di lavaggio concentrata deve essere conservata a 15...30°C ed è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 6 mesi a 15...30°C. La presenza di torbidità può indicare il deterioramento della soluzione di lavaggio.

MATERIALI NECESSARI, MA NON IN DOTAZIONE

Cod. 210200 Lamelle di applicazione dei campioni (1 x 10)

Cod. 210300 Lamelle di applicazione dei campioni (5 x 10)

Cod. 210100 Coppette per campioni monouso (100)

Cod. 5014 Peso di sviluppo

Cod. 3100 Preparazione REP

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

Soluzione fissativa: Miscelare 500ml di metanolo con 500ml di acqua distillata. Conservare in una bottiglia tappata ermeticamente.

Soluzione fisiologica (NaCl 0,85%)

Acqua distillata

I seguenti materiali non sono necessari per l'analisi delle urine standard, ma potrebbero servire per ulteriori indagini:

Cod. 220100 Antisiero per proteine totali nelle urine umane (2ml)

Cod. 220200 Antisiero per microproteine nelle urine umane (2ml)

Cod. 220300 Antisiero per macroproteine nelle urine umane (2ml)

Cod. 220400 Antisiero per proteine GAM umane (2ml)

Cod. 220700 Antisiero per catena leggera kappa libera e legata umana (2ml)

Cod. 220800 Antisiero per catena leggera lambda libera e legata umana (2ml)

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

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

Cod. 220900 Antisiero urine umane pentavalente / albumina (2ml)

Cod. 221000 Antisiero urine umano pentavalente (2ml)

Cod. 9249 Antisiero IgD

Cod. 9250 Antisiero IgE

RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Il siero fresco è il campione da preferire. I campioni possono essere conservati in frigorifero ad una temperatura compresa tra 2...6°C per un max. di 72 ore o per 2 settimane a -20°C. Inizialmente i campioni dovrebbero essere utilizzati senza alcuna concentrazione o diluizione, a meno che sia già noto che la quantità di proteine totali supera i 1000mg/l. Sottoponendo a scansione il gel ottenuto mediante densitometria è possibile avere una prima quantificazione delle proteine urinarie totali oppure le concentrazioni di singole zone proteiche utilizzando lo standard interno per proteine urinarie (Cod. N. 3032) nella procedura di preparazione del campione. Con ogni standard interno per proteine urinarie vengono fornite le istruzioni complete per l'uso.

PROCEDURA

1. Pipettare 35µl di campione nel pozzetto appropriato del vassoio per campioni SAS-I o nelle coppette per campioni monouso.
- i) **Solo per SAS-I e SAS-I Plus:** Collocare con cautela il vassoio per campioni sul cassetto di applicazione. Assicurarsi che il vassoio sia saldamente inserito in posizione.
- ii) **Solo per SAS-3:** Collocare con cautela il vassoio per campioni utilizzando i fermi di posizionamento della base di campioni. Assicurarsi che il vassoio sia posizionato saldamente.
2. Rimuovere il gel dalla confezione e:
 - i) **Solo per SAS-I:** Collocare il gel nel SAS-I con l'agarosio rivolto verso l'alto, allineando i lati positivo e negativo rispetto ai corrispondenti puntali degli elettrodi.
 - ii) **Solo per Plus:** Distribuire 400µL di preparazione REP sul dissipatore di calore. Collocare il gel sul dissipatore di calore con l'agarosio rivolto verso l'alto, allineando i lati positivo e negativo rispetto ai corrispondenti puntali degli elettrodi, prestando attenzione ad evitare bolle d'aria sotto il gel.
 - iii) **Solo per SAS-3:** Collocare la guida di allineamento sui fermi e distribuire 400µL di preparazione REP sul centro della camera. Collocare il gel nella camera con l'agarosio rivolto verso l'alto; utilizzando la guida, allineare i lati positivo e negativo rispetto ai corrispondenti puntali degli elettrodi, prestando attenzione ad evitare bolle d'aria sotto il gel.
3. Asciugare la superficie del gel con un blotter C, quindi gettarlo.
4. i) **Solo per SAS-I:** fissare gli elettrodi sul lato superiore dei puntali, in modo tale che entrino a contatto con i blocchi di gel.
ii) **Solo per SAS-I Plus:** (come sopra). Sistemare il coperchio sul gel e sugli elettrodi e premere con decisione per 5 secondi per consentire il contatto.
iii) **Solo per SAS-3:** fissare gli elettrodi sul lato superiore dei puntali, in modo tale che entrino a contatto con i blocchi di gel.
5. Collocare 2 gruppi di lamelle di applicazione sullo strumento (**per gli utilizzatori di SAS-3:** slot A e 10).

6. Eseguire l'elettroforesi di analisi delle urine:

i) **Solo per SAS-I:**

Analisi delle urine: (con il campione interno, Cod. 3032) 100 Volt per 16 minuti, 10 applicazioni

Analisi delle urine: (senza campione interno, Cod. 3032) 100 Volt per 17 minuti, 10 applicazioni

Immunofissazione: 80 Volt per 17 minuti, 10 applicazioni

ii) **Solo per SAS-I Plus:**

Analisi delle urine: (con il campione interno, Cod. 3032) 100 Volt per 20 minuti, 20°C, 10 applicazioni

Analisi delle urine: (senza campione interno, Cod. 3032) 100 Volt per 21 minuti, 20°C, 10 applicazioni

Immunofissazione: 80 Volt per 20 minuti, 20°C, 10 applicazioni

iii) **Solo per SAS-3:**

Fase	Tempo (mm:ss)	Temperatura (°C)	Tensione	Altro
Caricare campione	00:10	21		Velocità 1
Applicare campione	00:10	21		Velocità 1* ¹
Ripetere le fasi "Carica campione" e "Applica campione" per un totale di 10 applicazioni.				
Elettroforesi	18:00	20	100	
Asciugare	08:00	54* ²		

*¹ Utilizzare l'impostazione 2

*² Non eseguire la fase di essiccazione se è richiesta l'immunofissazione.

NOTA: Per l'analisi delle urine rimuovere i blocchi tampone prima dell'essiccazione.

7. In seguito all'elettroforesi (**per gli utilizzatori di SAS-I Plus:** rimuovere il coperchio), rimuovere gli elettrodi dalla superficie del gel. **NOTA:** I gel possono essere colorati per mostrare tutte le proteine presenti nel campione (ved. protocollo di colorazione) oppure possono essere incubati con antisieri specifici per mostrare proteine di particolare interesse (ved. protocollo di immunofissazione).

PROTOCOLLO DI COLORAZIONE

8. **Solo per SAS-I e SAS-I Plus:** Rimuovere entrambi i blocchi di gel utilizzando il Gel Block Remover.

9. Fissare il gel al supporto della camera di colorazione.

10. Selezionare il programma del test Urine sull'unità di colorazione e, seguendo le indicazioni, fissare, colorare, decolorare, lavare e asciugare il gel.

a) **SAS-2 (Auto-Stainer)**

Fase	Soluzione	Tempo (mm:ss)	Presca	Temperatura (°C)
Fissare	Soluzione fissativa	05:00	4	
Asciugare	—	15:00		65
Colorare	Colorante Acido Viola	10:00	5	
Lavare	Acqua distillata	00:10	1	
Lavare	Acqua distillata	00:10	1	
Decolorare	Soluzione decolorante	02:00	2	
Decolorare	Soluzione decolorante	02:00	2	
Lavare	Acqua	01:00	1	
Asciugare	—	15:00		65

b) SAS-4 (Auto-Stainer)

Fase	Tempo (mm:ss)	Temperatura (°C)	Altro
Colorare	04:00		Ricircolo ON
Decolorare	02:00		Ricircolo ON
Decolorare	02:00		Ricircolo ON
Asciugare	12:00	64	

c) Manuale

Seguire la sequenza indicata per il SAS-2 Auto-Stainer, utilizzando un bagno colorante per le fasi di fissaggio, colorazione, decolorazione e lavaggio, nonché un forno di essiccazione ad aria forzata a 60...70°C per le fasi di essiccazione.

11. Al termine del ciclo di colorazione, rimuovere il gel dalla camera di colorazione. Ora il gel è pronto per essere esaminato.

Protocollo di immunofissazione

8. Impostare i seguenti parametri nello strumento.

- i) **Solo per SAS-1:** Fase di incubazione 1: 10 minuti a 37°C (incubare)
Fase di incubazione 2: 8 minuti a 40°C (blot D)

ii) Solo per SAS-3:

Fase	Tempo (mm:ss)	Temperatura (°C)
Applicare antisieri	10:00	21
Inserire pettini	02:00	21
Blotter D	05:00	40
Asciugare	08:00	54

9. **Solo per SAS-3:** rimuovere la guida di allineamento). Posizionare la mascherina per l'applicazione dell'antisiero sulla superficie del gel. **NOTA:** Controllare che i canali zigrinati per la somministrazione degli antisieri siano allineati centralmente rispetto alle corsie stampate presenti sul gel su cui vengono applicati i campioni.
10. Applicare due gocce (o 50µl) dell'appropriato antisiero o fissativo nell'apposito foro delle corsie di immunoglobuline. Controllare che gli antisieri riempiano completamente i canali.
11. **Solo per SAS-1:** Incubare il gel: 15...30°C per 10 minuti.
Solo per SAS-1 Plus: Incubare il gel.
12. Al termine dell'incubazione, collocare un pettine blotter nei fori della mascherina dell'antisiero. Lasciare assorbire l'eccesso di antisieri per 2 minuti, quindi rimuovere i pettini blotter e la mascherina dalla superficie del gel.
13. i) **Solo per SAS-1:** Rimuovere i blocchi di gel utilizzando il Gel Block Remover e lavare il gel nella soluzione di lavaggio per 5 minuti.
ii) **Solo per SAS-1 Plus e SAS-3:** Posizionare un blotter D (con il lato liscio verso il basso) sulla superficie del gel, lasciarvelo per 10 secondi e quindi rimuoverlo.
14. i) **Solo per SAS-1:** Collocare il gel su un blotter D, con il lato dell'agarosio rivolto verso l'alto, e posizionare un blotter B (bagnato in soluzione di lavaggio) sulla superficie del gel, seguito da 2 blotter X. Premere il gel utilizzando il peso di sviluppo per 10 minuti.

- ii) **Solo per SAS-1 Plus e SAS-3:** Posizionare un blotter D (con il lato liscio verso il basso) sulla superficie del gel e riposizionare la mascherina dell'antisiero in modo da lasciare in piano il blotter. Asciugare il gel.
15. i) **Solo per SAS-1:** Rimuovere i blotter e mettere il gel nella soluzione di lavaggio per 4 minuti agitando delicatamente.
 ii) **Solo per SAS-1 Plus:** Rimuovere il blotter D.
 iii) **Solo per SAS-3:** Rimuovere il blotter D e asciugare il gel.
16. i) **Solo per SAS-1:** Togliere il gel dalla soluzione di lavaggio e porlo su un blotter D, con il lato dell'agarosio rivolto verso l'alto. Collocare un blotter B (bagnato in soluzione di lavaggio) sulla superficie del gel, seguito da un blotter D. Comprimere il gel per 3 minuti.
 ii) **Solo per SAS-1 Plus e SAS-3:** Rimuovere i blocchi di gel utilizzando il Gel Block Remover. Passare al punto 18.
17. i) **Solo per SAS-1:** Rimuovere i blotter.
18. Fissare il gel al supporto della camera di colorazione.
NOTA: Subito dopo l'uso, pulire le mascherine degli antisieri con una soluzione detergente germicida delicata. Se possibile, strofinare la parte inferiore del modello con uno spazzolino o un piccolo scovolino. Fare in modo che gli antisieri non vadano soggetti ad evaporazione sulla mascherina. L'accumulo di antisiero sulla superficie della mascherina determina la formazione di bolle durante la fase di applicazione degli antisieri. Asciugare bene la mascherina dell'antisiero. Residui di acqua all'interno dei fori ostacoleranno l'applicazione degli antisieri al successivo utilizzo. Conservare la mascherina in posizione capovolta in modo da aumentare il ricircolo dell'aria e quindi il potenziale di asciugatura dell'applicatore.
19. Selezionare il programma del test IFE per urina sull'unità di colorazione e, seguendo le indicazioni, lavare, colorare, decolorare e asciugare il gel.

a) SAS-2 (Auto-Stainer)

Fase	Soluzione	Tempo (mm:ss)	Presi	Temperatura (°C)
Asciugare	—	10:00		55
Lavare	Soluzione di lavaggio	07:00	4	
Colorante	colorante Acido Viola concentrato	03:00	5	
Decolorare	Soluzione decolorante	02:00	2	
Asciugare	—	05:00		65
Lavare	Soluzione di lavaggio	03:00	4	
Lavare	Soluzione di lavaggio	03:00	4	
Asciugare	—	05:00		65

b) SAS-4 (Auto-Stainer)

Fase	Tempo (mm:ss)	Temperatura (°C)	Altro
Lavare	00:03		Ricircolo ON
Lavare	10:00		Ricircolo ON
Colorare	04:00		Ricircolo ON
Decolorare	02:00		Ricircolo ON
Decolorare	02:00		Ricircolo ON
Asciugare	12:00	63	

c) Manuale

Seguire la sequenza indicata per il SAS-2 Auto-Stainer, utilizzando un bagno colorante per le fasi di lavaggio, colorazione e decolorazione, nonché un forno di essiccazione ad aria forzata a 60...70°C per le fasi di essiccazione.

20. Al termine del ciclo di colorazione, rimuovere il gel dalla camera di colorazione. Ora il gel è pronto per essere esaminato.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La maggior parte delle proteine monoclonali migra nella regione gamma del catodo del pattern proteico, ma a causa della loro natura anomala, potrebbero migrare in qualsiasi punto della frazione globulinica in seguito ad elettroforesi proteica. 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. Le proteine anomale vengono identificate dal tipo di antisiero con cui reagiscono.

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" è disponibile dal Helena BioSciences, su richiesta.

Interpretazione visiva delle bande presenti sul gel mediante immunofissazione:

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 nell'estremità catodica della regione gamma senza reattività con antisieri IFE.

La proteina C reattiva (CRP) è rilevabile in pazienti con risposta infiammatoria acuta^{6,7}. 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

A volte un campione può reagire con un antisiero anti catena pesante ma non necessariamente con una 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 le 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

a) Riproducibilità

Banda	Entro la serie (n=24)		Tra la serie (=4)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
Banda 1	54.9	2.7	53.6	3.0
Banda 2	5.0	8.3	5.2	9.5
Banda 3	8.9	9.1	9.3	9.2
Banda 4	9.7	7.3	9.8	7.5
Banda 5	6.8	8.9	7.1	10.4
Banda 6	14.6	6.8	12.6	6.9

b) Sensibilità:

50ng per banda (equivalente a 10mg/L nel campione), determinati come la concentrazione più bassa di proteina presente come banda distinta sul gel completato.

c) Linearità:

La linearità è una funzione della specificazione densitometrica nonché delle prestazioni del gel. Si raccomanda ad ogni cliente di determinare la linearità del metodo sulla base del densitometro in uso nel laboratorio.

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. Alper, C.A and Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox. Sang., 1969; 17 : 445-452.
7. 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.
8. Microprotein - PR™ (Procedure No. 611) Sigma Diagnostics, September 1995.

USO PREVISTO

El kit de análisis de orina SAS-I está pensado para el tamizado de muestras de orina sin concentrar mediante electroforesis con gel de agarosa.

Las proteínas de la orina proceden principalmente de proteínas plasmáticas que se filtran a través del riñón. La aparición de proteínas plasmáticas anormales en la orina tiene un gran valor para la evaluación de las funciones renales. Un estudio adecuado de la proteinuria debiera incluir una valoración cuantitativa y cualitativa del tipo y cantidad de proteínas excretadas^{1,5}. La combinación de la separación electroforética de las proteínas de la orina, unida a la identificación de tipos específicos de proteínas por inmunoprecipitación permite la distinción de varios tipos de proteinuria - fisiológica, glomerular (selectiva y no selectiva), tubular y proteinuria asociada con disglobulinemias^{1,5}. El kit de análisis de la orina SAS-3 separa las proteínas de la orina de acuerdo con la carga de gel de agarosa.

Luego las proteínas son coloreadas para hacerlas visibles y poder realizar una interpretación cuantitativa y cualitativa. El colorante de alta sensibilidad utilizado en el kit permite examinar la mayoría de las muestras de orina sin una concentración previa, y el uso del Modelo Interno de Proteínas de la Orina permite obtener una aproximación al total de proteínas en la orina, o determinar por densitometría concentraciones de proteínas en bandas individuales.

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 SAS-I de análisis de orina

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

2. Colorante Violeta Ácido

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

3. Solución decolorante concentrada.

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

4. Solución de lavado

Contiene solución de lavado concentrada. Diluir el contenido del frasco en 2 litros con solución acuosa.

5. Otros componentes del kit

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

ALMACENAMIENTO Y PERÍODO DE VALIDEZ**1. Gel SAS-I de análisis de orina**

Los geles han de almacenarse a 15...30°C y permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. **NO REFRIGERAR NI CONGELAR.** El deterioro del gel se puede identificar 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 fungen bacterianas o micóticas

2. Colorante violeta ácido

El colorante concentrado ha de almacenarse a 15...30°C y es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. La solución colorante diluida es estable a 15...30°C hasta 6 meses. Se recomienda desechar el colorante usado inmediatamente para el agotamiento de su capacidad de coloración. Unos malos resultados en la coloración pueden ser indicio de deterioro de la solución colorante.

3. Solución decolorante

El concentrado decolorante debe guardarse a 15...30°C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. La solución decolorante diluida es estable durante 6 meses a 15...30°C.

4. Solución de lavado

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

ARTÍCULOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

Nº de catálogo 210200 Aplicadores de muestras 1 x 10

Nº de catálogo 210300 Aplicadores de muestras 5 x 10

Nº de catálogo 210100 Vasos de recogida de muestras desechables 100

Nº de catálogo 5014 Potencia de desarrollo

Nº de catálogo 3100 REP Prep

Horno con aire a presión con capacidad para alcanzar 60...70°C

Solución fijadora: Mezclar 500ml de metanol con 500ml de agua destilada. Guardar en un frasco herméticamente cerrado.

Solución Salina (0,85% NaCl)

Agua destilada

Los siguientes artículos no son necesarios para el análisis de la orina, pero puede que se requieran para investigaciones posteriores.

Nº de catálogo 220100 Antisuero para la Proteína Total de la Orina Humana (2ml)

Nº de catálogo 220200 Antisuero para las Microproteínas de la Orina Humana (2ml)

Nº de catálogo 220300 Antisuero para las Macroproteínas de la Orina Humana (2ml)

Nº de catálogo 220400 Antisuero para las Proteínas GAM Humanas (2ml)

Nº de catálogo 220700 Antisuero para las cadenas humanas sueltas & ligeras Bound Kappa (2ml)

Nº de catálogo 220800 Antisuero para las cadenas humanas sueltas & ligeras Bound Lambda (2ml)

Nº de catálogo 220500 Antisuero para las cadenas humanas sueltas & ligeras Kappa (2ml)

Nº de catálogo 220600 Antisuero para las cadenas humanas sueltas & ligeras Lambda (2ml)

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

Nº de catálogo 221000 Antisuero para la Orina Humana Pentavalente (2ml)

Nº de catálogo 9249 Antisuero para el IgD Humano

Nº de catálogo 9250 Antisuero para el IgE Humano

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La muestra elegida es orina recién recogida. Las muestras se pueden guardar en el frigorífico a 2...6°C hasta 72 horas, o durante 2 semanas a -20°C. Inicialmente las muestras se utilizarán sin concentración ni dilución, a no ser que se sepa que las proteínas totales exceden los 1.000mg/L. Si se tamiza el gel completado mediante densitometría, se puede obtener una indicación del total de proteínas de la orina, o la concentración de zonas de proteínas individuales, incorporando el Modelo Interno de Proteínas de la Orina (Nº de cat. 3032) al procedimiento de preparación de la muestra. Con cada Modelo Interno de Proteínas de la Orina se proporcionan unas instrucciones de uso completas.

PROCEDIMIENTO PASO A PASO

1. Con una pipeta, introducir 35µl de la muestra en la cavidad correspondiente de la bandeja de muestras SAS-I o en vasos de recogida de muestras desechables.
 - i) **Solo para SAS-I y SAS-I Plus:** Colocar cuidadosamente la bandeja con la muestra en la gaveta del aplicador. Asegurarse de que la bandeja está firmemente introducida en su posición.
 - ii) **Solo para SAS-3:** Colocar cuidadosamente la bandeja con la muestra utilizando los pasadores de localización de la base de la muestra. Asegurarse de que la bandeja está en una posición segura.
2. Sacar el gel del envase y:
 - i) **Solo para SAS-I:** colocar el gel en el SAS-I, con la agarosa hacia arriba, alineando los lados positivo y negativo con los bordes de los electrodos correspondientes.
 - ii) **Solo para SAS-I Plus:** pipetear 400µL de REP Prep en el disipador térmico. Colocar el gel en el disipador térmico, con el lado de agarosa hacia arriba, alineando los lados positivo y negativo con los bordes, teniendo cuidado de evitar las burbujas aéreas debajo del gel.
 - iii) **Solo para SAS-3:** colocar la guía de alineación en los pasadores y pipetear 400µL de REP Prep en el centro de la cámara. Colocar el gel en la cámara con la agarosa hacia arriba, utilizar la guía para alinear los lados positivo y negativo con los bordes, teniendo cuidado de evitar las burbujas aéreas debajo del gel
3. Secar la superficie del gel con un secante C y luego desechar el secante.
4.
 - i) **Solo para SAS-I:** conectar los electrodos a la parte superior de los bordes, de forma que estén en contacto con los bloques de gel.
 - ii) **Solo para SAS-I Plus:** (igual que el anterior). Colocar la cubierta del gel sobre el gel y los electrodos, presionar con firmeza durante 5 segundos para asegurar un buen contacto.
 - iii) **Solo para SAS-3:** conectar los electrodos a los bordes, de forma que estén en contacto con los bloques de gel.
5. Colocar dos unidades de aplicadores en la posición del instrumento (**usuarios de SAS-3:** ranuras A y I0).

6. Realizar la electroforesis del Análisis de Orina:

i) **Solo para SAS-I:**

Análisis de orina: (con estándar, N° de catálogo 3032) 100 voltios, 16 min., 10 aplicaciones

Análisis de orina: (sin estándar interno, N° de catálogo 3032) 100 voltios, 17 min., 10 aplicaciones

Inmunofijación: 80 voltios, 17 min., 10 aplicaciones

ii) **Solo para SAS-I Plus:**

Análisis de orina: (con estándar, N° de catálogo 3032) 100 voltios, 20 min., 20°C, 10 aplicaciones

Análisis de orina: (sin estándar interno, N° de catálogo 3032) 100 voltios, 21 min., 20°C, 10 aplicaciones

Inmunofijación: 80 voltios, 20 min., 20°C, 10 aplicaciones

ii) **Solo para SAS-3:**

Paso	Hora (mm:ss)	Temperatura (°C)	Tensión	Otros
Cargar muestra	00:10	21		Velocidad I
Aplicar muestra	00:10	21		Velocidad I* ¹

Repetir pasos 'cargar muestra, aplicar muestra' para un total de 10 aplicaciones.

Electroforesis	18:00	20	100
Secar	08:00	54* ²	

*¹ Utilizar la posición 2

*² No incluir el paso Secar si es necesaria la inmunofijación.

NOTA: Para Análisis de Orina, retirar los bloques también antes de secar.

7. Después de la electroforesis, (**Solo para SAS-I Plus:** retirar la cubierta), retirar los electrodos de la superficie del gel. **NOTA:** Los geles se pueden colorear para ver todas las proteínas presentes en la muestra (véase el protocolo de coloración) o se pueden incubar con antisueros específicos para ver proteínas determinadas (véase el protocolo de inmunofijación).

PROTOCOLO DE COLORACIÓN

8. **Solo para SAS-I y SAS-I Plus:** Sacar ambos bloques de gel utilizando el extractor de bloques de gel.

9. Sujetar el gel al soporte de la cámara de coloración.

10. Seleccionar el programa de Orina y, siguiendo las instrucciones, fijar, colorar, decolorar, lavar y secar el gel.

a) **SAS-2 (Colorante automático):**

Paso	Solución	Hora (mm:ss)	Puerto	Temperatura (°C)
Fijar	Solución fijadora	05:00	4	
Secar	—	15:00		65
Colorear	Colorante violeta ácido	10:00	5	
Lavar	Agua destilada	00:10	1	
Lavar	Agua destilada	00:10	1	
Decolorar	Solución decoloradora	02:00	2	
Decolorar	Solución decoloradora	02:00	2	
Lavar	Agua	01:00	1	
Secar	—	15:00		65

b) SAS-4 (Colorante automático):

Paso	Hora (mm:ss)	Temperatura (°C)	Otros
Colorear	04:00		Recirculación ON
Decolorar	02:00		Recirculación ON
Decolorar	02:00		Recirculación ON
Secar	12:00	64	

c) Manual

Seguir la secuencia mencionada para el Colorante Automático SAS-2, utilizando un baño de coloración para los pasos de fijar, colorar, decolorar y lavar, y un horno de secado con aire a presión a 60...70°C para los pasos de secado.

11. Finalizado el ciclo de coloración, sacar el gel de la cámara de coloración. Ahora, el gel está listo para ser examinado.

Protocolo de inmunofijación

8. Programar los siguientes parámetros en el instrumento.

- i) **Solo para SAS-I Plus:** Incubation step 1 (Paso de incubación 1): 10 min., 37°C (incubar)
Incubation step 2 (Paso de incubación 2): 8 min., 40°C (secado D)

ii) Solo para SAS-3:

Paso	Hora (mm:ss)	Temperatura (°C)
Aplicar el antisuero	10:00	21
Introducir combinaciones	02:00	21
Secante D	05:00	40
Secar	08:00	54

9. **(Solo para SAS-3:** sacar la guía de alineación). Colocar la aplicación de antisuero sobre la superficie del gel. **NOTA:** Los canales laminados del antisuero deben alinearse en el centro por encima de la caja impresa sobre el gel en el que se aplican las muestras.
10. Aplicar 2 gotas (o 50 µl) del antisuero / fijador apropiado en el orificio de las vías de inmunoglobina. Asegurarse de que el antisuero ha empapado completamente los canales.
11. **Solo para SAS-I:** Incubar el gel: 15...30°C, 10 minutos.
Solo para SAS-I Plus: Incubar el gel
12. Finalizada la incubación, colocar una combinación de secantes en los agujeros de la base de la plantilla del antisuero. Dejar 2 minutos para que se absorba el antisuero sobrante y después retirar las combinaciones de secantes y la plantilla de la superficie del gel.
13. i) **Solo para SAS-I:** Retirar los bloques de gel utilizando el extractor de bloques de gel y lavar el gel en una solución de lavado durante 5 minutos.
ii) **Solo para SAS-I Plus y SAS-3:** Colocar un secante D (la cara suave hacia abajo) sobre la superficie del gel, dejar 10 segundos y retirar.
14. i) **Solo para SAS-I:** Colocar el gel en un secante D con la agarosa hacia arriba y un secante B (humedecido en solución de lavado) en la superficie del gel, seguido de dos secantes X. Presionar el gel usando una potencia de desarrollo durante 10 minutos.
ii) **Solo para SAS-I Plus y SAS-3:** Colocar un secante D (la cara suave hacia abajo) sobre la superficie del gel y sustituir la plantilla del antisuero para que el secante quede liso. Secar el gel.

15. **i) Solo para SAS-I:** Retirar los secantes y colocar el gel en solución de lavado durante 4 minutos, agitando suavemente.
ii) Solo para SAS-I Plus: Retirar el secante D.
iii) Solo para SAS-3: Retirar el secante D y secar el gel.
16. **i) Solo para SAS-I:** Retirar el gel de la solución de lavado y colocarlo sobre un secante D con la agarosa hacia arriba. Colocar un secante B (empapado en solución de lavado) sobre la superficie del gel, seguido por un secante D. Presionar el gel durante 3 minutos.
ii) Solo para SAS-I Plus y SAS-3: Sacar los bloques de gel utilizando el extractor de bloques de gel. Vaya al paso 18.
17. **f) Solo para SAS-I:** Retirar los secantes.
18. Sujetar el gel al soporte de la cámara de coloración.

NOTA: Inmediatamente después de su utilización, limpiar la plantilla del antisuero con un detergente suave y biocida. Si es posible, restregar la base de la plantilla con un cepillo de dientes o con un cepillo pequeño para tubos de pruebas. Evitar que el antisuero se seque en la plantilla. La acumulación de antisuero en la superficie de la plantilla hará que se formen burbujas de aire durante el paso de aplicación del antisuero. Secar el antisuero de la plantilla meticulosamente. El agua que quede en los agujeros dificultará la aplicación del antisuero en su próxima utilización. Almacenar la plantilla boca abajo para aumentar la circulación del aire y el potencial de secado del aplicador.

19. Seleccionar el programa IFE de Orina y, siguiendo las instrucciones, lavar, colorar, decolorar y secar el gel.

a) SAS-2 (Colorante automático):

Paso	Solución	Hora (mm:ss)	Puerto	Temperatura (°C)
Secar	—	10:00		55
Lavar	Solución de lavado	07:00	4	
Colorear	Colorante violeta ácido	03:00	5	
Decolorar	Solución decoloradora	02:00	2	
Secar	—	05:00		65
Lavar	Solución de lavado	03:00	4	
Lavar	Solución de lavado	03:00	4	
Secar	—	05:00		65

b) SAS-4 (Colorante automático):

Paso	Hora (mm:ss)	Temperatura (°C)	Otros
Lavar	00:03		Recirculación ON
Lavar	10:00		Recirculación ON
Colorear	04:00		Recirculación ON
Decolorar	02:00		Recirculación ON
Decolorar	02:00		Recirculación ON
Secar	12:00	63	

c) Manual

Seguir la secuencia mencionada para el Colorante Automático SAS-2, utilizando un baño de coloración para los pasos de lavar, colorear y decolorar, y un horno de secado con aire a presión a 60...70°C para los pasos de secado.

20. Finalizado el ciclo de coloración, sacar el gel de la cámara de coloración. Ahora, el gel está listo para ser examinado.

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.

Interpretación visual de bandas existentes en el gel por inmunofijación.

Tipo de Proteinuria	Bandas Observadas en el Gel	Proteínas halladas
Orina normal	Banda de albúmina pequeña	albúmina
Glomerular	Albúmina, alfa-1, beta, gamma	albúmina, alfa-1 antitripsina, transferina, gammaglobulinas
Tubular	alfa-1, alfa-2, beta	Proteínas ligadas al retinol beta2-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 antisueros de inmunofijación.

C Pueden detectarse proteínas reactivas (CRP) en pacientes con respuestas inflamatorias agudas^{6,7}. Las CRP aparecen como una banda estrecha en el borde catódico del modelo de proteína de suero. Altos niveles de Antitripsina-Alfa1 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 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**a) Reproducibilidad.**

Banda	Dentro de la ejecución (n=24)		Entre la ejecución (n=4)	
	Media (%)	CV (%)	Media (%)	CV (%)
Banda 1	54,9	2,7	53,6	3,0
Banda 2	5,0	8,3	5,2	9,5
Banda 3	8,9	9,1	9,3	9,2
Banda 4	9,7	7,3	9,8	7,5
Banda 5	6,8	8,9	7,1	10,4
Banda 6	14,6	6,8	12,6	6,9

b) Sensibilidad:

50ng por banda (equivalentes a 10mg/L en la muestra), determinada como la concentración más baja de proteínas que se hizo evidente en forma de una discreta banda sobre el gel completado.

c) Linealidad:

La linealidad es una función de las especificaciones del densitómetro, así como del comportamiento del gel. Es aconsejable que cada cliente determine la linealidad del método basándose en el densitómetro utilizado en el laboratorio.

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. Alper, C.A y Johnson, A.M., 'Immunofixation Electrophoresis: A Technique for the Study of Protein Polymorphism', Vox. Sang., 1969; 17 : 445-452.

7. 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.
8. Microprotein-PR™ (Procedure No. 611) Sigma Diagnostics, September 1995.

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-2-1344P 2007/01 (8)