sebia

HYDRAGEL IF K20

Ref. 3031

Masque standard / Standard mask

IVD

CE

2011/02

ESPECIFICACIONES DE USO

El kit HYDRAGEL IF K20 está diseñado para la detección de proteínas monoclonales en suero humano mediante electroforesis e inmunofijación en geles de agarosa alcalinos (pH 9.1). Las proteínas séricas son sometidas a electroforesis y después son inmunofijadas con antisueros con diferentes especificidades: anti-cadenas pesadas gamma (Ig G), alfa (Ig A) y mu (Ig M), y anti-cadenas ligeras kappa y lambda (libres y unidas). Después de la inmunofijación, las proteínas precipitadas se tiñen con violeta ácido. El exceso de colorante se elimina con una solución ácida.

Cada gel de agarosa en el kit HYDRAGEL IF K20 está pensado para analizar una muestra.

Para Uso Diagnóstico *In Vitro.*

PRINCIPIO DEL TEST

Las bandas anormales en los patrones electroforéticos de las proteínas séricas, principalmente aquellas que aparecen en las fracciones de beta-globulinas y gamma-globulinas, son siempre sospechosas de ser proteínas monoclonales y, por lo tanto, son un indicio de gammapatías. Para identificar esas bandas anormales se utiliza la técnica de la inmunofijación.
La electroforesis seguida de inmunofijación es una técnica sencilla que permite que una proteína sea fijada *in situ* después de la electroforesis, mediante la formación de un complejo insoluble con su anticuerpo. Se realiza en cuatro etapas:

1. Separación de las proteínas mediante electroforesis en gel de agarosa.
2. Fijación e inmunoprecipitación de las proteínas separadas mediante electroforesis: la solución fijadora y los antisueros se dispensan directamente sobre la superficie del gel en los carriles de migración electroforética apropiados. La solución fijadora y los antisueros difunden en el gel precipitando toas las proteínas y los antígenos correspondientes, respectivamente.
3. Las proteínas solubles no precipitadas son eliminadas del gel mediante absorción con papel y lavado. La precipitina del complejo antígeno-anticuerpo queda atrapada en la matriz del gel.
4. Las proteínas precipitadas son visualizadas mediante tinción. Las bandas inmunoprecipitadas son entonces comparadas con las bandas anormales correspondientes que aparecen en el patrón electroforético de la muestra de suero.

Para detectar e identificar los componentes monoclonales sospechosos, las muestras son sometidas a electroforesis en seis carriles simultáneamente. Después de la electroforesis, un carril (ELP) sirve como referencia ya que muestra el patrón electroforético de las proteínas de la muestra. Los cinco carriles restantes permiten la identificación del(los) componente(s) monoclonal(es) a partir de su(s) reacción(es), o falta de ésta, con los antisueros frente a cadenas pesadas gamma (Ig G), alfa (Ig A) y mu (Ig M), y frente a cadenas ligeras kappa y lambda libres y unidas.
Esta técnica sencilla y rápida proporciona una imagen clara y fácilmente interpretable.

REACTIVOS Y MATERIALES SUMINISTRADOS EN EL KIT HYDRAGEL IF K20

ARTÍCULOS	REF. N° 3031
Geles de Agarosa (listos para usar)	10 geles
Tampón Tris-Barbital (solución stock)	3 viales de 75 mL
Colorante Violeta Ácido (solución stock)	1 vial de 75 mL
Solución Decolorante (solución stock)	1 vial de 100 mL
Diluyente (listo para usar)	1 vial de 3.2 mL
Aplicadores de 6 dientes (listos para usar)	1 caja de 10
Papeles de Filtro - Finos	1 paquete de 10
Peines de Papel de Filtro	1 paquete de 10
Papeles de Filtro - Gruesos	2 paquetes de 10

NOTA: La solución fijadora y los antisueros se comercializan por separado (consulte REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS).

PARA OBTENER RESULTADOS ÓPTIMOS :
Los elementos de un mismo kit deben utilizarse conjuntamente y según las instrucciones incluidas.
LEER ATENTAMENTE LAS INSTRUCCIONES.

1. GELES DE AGAROSA

Preparación

Los geles de agarosa están listos para su uso. Cada gel contiene: agarosa, 0.8 g/dL ; tampón tris-barbital pH 9.1 ± 0.1 ; aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

ADVERTENCIA: Los geles de agarosa contienen un 0.31 % de barbital y un 0.34 % de barbital sódico. ¡No los ingiera! ¡Si los ha ingerido consulte a un médico inmediatamente!

Uso

Medio de soporte para la electroforesis de proteínas y la inmunofijación posterior.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro

Almacene los geles horizontalmente en su envoltorio protector original a temperatura ambiente (15 a 30 °C) o refrigerados (2 a 8 °C). Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit y en las etiquetas del envoltorio. (La flecha situada en la cara frontal del kit debe apuntar hacia arriba). Evite el almacenaje cerca de una ventana o de una fuente de calor. Evite variaciones de temperatura importantes durante el almacenamiento.
NO LOS CONGELE.
Deséchelos cuando:
(I) se formen cristales o precipitados en la superficie del gel o su textura sea muy blanda (consecuencias de la congelación del gel),
(II) se observe crecimiento bacteriano o fúngico,
(III) haya una cantidad anormal de líquido en la caja del gel (como resultado de la exudación del tampón debida a un almacenamiento inadecuado).

2. TAMPÓN TRIS-BARBITAL

Preparación
Cada vial de la solución stock del tampón se diluye hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.
Después de la dilución, la solución de trabajo contiene: tris-barbital pH 9.2 ± 0.3 ; azida sódica.

ADVERTENCIA: Cada vial de la solución stock del tampón contiene un 2.45 % de barbital, un 13.73 % de barbital sódico y un 0.13 % de azida sódica. ¡No lo ingiera! ¡Si lo ha ingerido consulte a un médico inmediatamente! Evite el contacto con ácidos, plomo o cobre, ya que se conoce su tendencia a formar compuestos explosivos o tóxicos con la azida sódica. Lave siempre con una gran cantidad de agua al desechar el producto.

Uso
Tampón de electroforesis.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacene la solución stock del tampón a temperatura ambiente o refrigerada. La solución stock es estable durante varios años, por lo menos hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas del vial. La solución diluida del tampón es estable durante un año a temperatura ambiente en una botella cerrada.
Deseche la solución diluida del tampón si cambia su aspecto, por ejemplo, se vuelve turbia debido a contaminación microbiana.

3. COLORANTE VIOLETA ÁCIDO

Preparación
El vial del colorante violeta ácido stock se diluye hasta 300 mL con agua destilada o desionizada.
Después de la dilución, la solución de trabajo del colorante contiene: solución ácida pH ≈ 2 ; violeta ácido, 0.2 g/dL ; etilén-glicol, 3.25 % ; aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

ADVERTENCIA: Es perjudicial si se ingiere.

Uso
Para teñir los geles después de la electroforesis de proteínas e inmunofijación posterior.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacene las soluciones stock y de trabajo del colorante a temperatura ambiente o refrigeradas en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución stock del colorante es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas del vial. La solución de trabajo del colorante es estable durante 6 meses.

4. SOLUCIÓN DECOLORANTE

Preparación
Cada vial de la solución decolorante stock se diluye hasta 100 litros con agua destilada o desionizada. Es conveniente diluir sólo 1 mL de la solución stock hasta 1 litro. Después de la dilución, la solución de trabajo del decolorante contiene: ácido cítrico, 0.05 g/dL.

Uso
Para decolorar, es decir, para eliminar el exceso de tinción y la coloración de fondo de los geles.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacene la solución decolorante stock a temperatura ambiente o refrigerada. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas del vial. La solución de trabajo del decolorante es estable durante una semana a temperatura ambiente en una botella cerrada. No le añada azida sódica.
Deseche la solución de trabajo del decolorante si cambia su aspecto, por ejemplo, se vuelve turbia debido a contaminación microbiana.
Para evitar la proliferación microbiana en la solución decolorante diluida que se vaya a almacenar durante más de una semana, añada 5 µL/dL de ProClin 300.
El decolorante diluido al que se ha añadido ProClin es estable en un contenedor cerrado a temperatura ambiente o en la nevera hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de decolorante.

5. DILUYENTE

Preparación
El diluyente está listo para usar. Contiene: tampón pH 7.5 ± 0.3 ; azul de bromofenol ; aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

Uso
Para diluir las muestras. El azul de bromofenol se utiliza como un marcador conveniente de la aplicación y la migración.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacene el diluyente a temperatura ambiente o refrigerado. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas del vial.
El diluyente debe estar exento de precipitados.

6. APLICADORES

Uso
Aplicadores precortados de un solo uso para la aplicación de la muestra.

Almacenamiento
Almacene los aplicadores en un lugar seco a temperatura ambiente o refrigerados.

7. PAPELES DE FILTRO – FINOS

Uso
Papeles de filtro finos absorbentes, de un solo uso, para absorber el exceso de humedad de la superficie del gel antes de la aplicación de la muestra.

Conservación
Les papeles de filtro finos deben conservarse en un lugar seco a temperatura ambiente o en la nevera.

8. PEINES DE PAPEL DE FILTRO

Uso
Peines precortados de papel de filtro grueso, de un solo uso, para absorber el exceso de solución fijadora y antisueros de la superficie del gel después de la inmunofijación.

9. PAPELES DE FILTRO – GRUESOS

Uso
Papeles de filtro gruesos absorbentes, de un solo uso, para absorber las proteínas no precipitadas del gel después de la inmunofijación.

Conservación
Los papeles de filtro gruesos deben conservarse en un lugar seco a temperatura ambiente o en la nevera.

REACTIVOS NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

1. CAJA DE ANTISUEROS Y SOLUCIÓN FIJADORA PARA IF
La caja de Antisueros y Solución Fijadora para inmunofijación IF, Plantilla estándar (SEBIA, referencia N° 4815) contiene cinco viales de antisueros, anti-Ig G, anti-Ig A, anti-Ig M, anti-Kappa (cadenas ligeras libres y ligadas) y anti-Lambda (cadenas ligeras libres y ligadas) de 1 ml cada uno, y un vial de solución fijadora de 2.5 ml, **específicos de la técnica de inmunofijación realizada con las plantillas 1 IF, SEBIA.**

1.1 ANTISUEROS

Preparación
Están listos para su uso. Todos los antisueros son inmunoglobulinas de mamífero totales anti-humanas. Par una fácil identificación de los antisueros y como ayuda para controlar su aplicación, los antisueros están coloreados con distintos colorantes no tóxicos como se indica en el Procedimiento, Sección II. 6. Los colores de las etiquetas de los viales coinciden con los del antisuero correspondiente.

Uso
Para inmunofijar las proteínas separadas mediante electroforesis.

NOTA: Los antisueros son específicos de la técnica de inmunofijación realizada con las plantillas 1 IF, SEBIA.

Los antisueros pueden ser de orígenes animales diferentes. Por ello es muy importante no mezclar dos frascos diferentes de antisueros, incluso de la misma especificidad, y SIEMPRE cambiar la punta de la pipeta después de pipetear en cada frasco.

IMPORTANTE: Para evitar cualquier contaminación entre los diferentes reactivos, es imperativo poner cada tapón sobre el vial correspondiente después de usarlo.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacene los antisueros refrigerados (2 a 8 °C). Son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas de los viales de antisuero.
Deséchelos si cambia su aspecto, por ejemplo, se vuelven turbios debido a contaminación microbiana.

NOTA: Durante el transporte, los antisueros pueden permanecer sin refrigeración (15 a 30 °C) durante 15 días sin ningún efecto adverso en su funcionamiento.

1.2 SOLUCIÓN FIJADORA

Preparación
La solución fijadora está lista para su uso. Contiene: solución ácida ; aditivos, inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo. Para una fácil identificación y como ayuda para controlar su aplicación, la solución fijadora está coloreada con un colorante no tóxico cuyo color coincide con el de la etiqueta del vial (vea Procedimiento, Sección II. 6.).

Uso
Para fijar las proteínas separadas mediante electroforesis en el carril de referencia (ELP).

NOTA: La solución fijadora es específica de la técnica de inmunofijación realizada con las plantillas 1 IF, SEBIA.

IMPORTANTE: Para evitar cualquier contaminación entre los diferentes reactivos, es imperativo poner cada tapón sobre el vial correspondiente después de usarlo.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacene la solución fijadora a temperatura ambiente o refrigerada. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja del kit o en las etiquetas del vial.
La solución fijadora debe estar exenta de precipitados.

2. SALINA

Preparación
Prepare una solución de NaCl 0.15 M (0.9 g/dL) con agua destilada o desionizada.

Uso
Para lavar los geles después de la incubación con solución fijadora y antisueros.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacénela a temperatura ambiente o refrigerada. Deséchela después de 3 meses o si cambia su aspecto, por ejemplo, se vuelve turbia debido a contaminación microbiana. Para períodos de almacenaje más prolongados, añada azida sódica, 0.1 g/dL.

3. COLORANTE NEGRO AMIDO (SEBIA, PN 4554) (opcional)

Preparación
El colorante negro amido concentrado es una solución viscosa que puede gelificarse, lo que no afecta de ningún modo a la calidad de la solución final y su capacidad de coloración.
Para obtener una perfecta reconstitución del colorante, siempre hay que prepararlo como se indica a continuación :

1. Añada unos 15 mL de diluyente del colorante en el vial de negro amido concentrado.
2. Cierre el vial con cuidado.
3. Agite el vial intensamente durante un mínimo de 5 segundos.
4. Vierta la solución obtenida en el recipiente de preparación de la solución de coloración.

5. Repita esta operación dos veces, o tres veces si es necesario.
6. Vierta el resto de diluyente en el recipiente de preparación de la solución de coloración.
7. Complete hasta 300 mL con agua destilada o desionizada.
8. Agite esta solución de 5 a 10 minutos.

El colorante está listo para usar.

NOTA : Una reconstitución incompleta del colorante puede implicar una mala coloración de la fracción albúmina (disminución de su porcentaje o aparición de un agujero blanco en el centro de la fracción).

Después de la dilución, la solución colorante contiene: solución ácida pH ≈ 2 ; negro amido, 4 g/L ; etilén-glicol, 6,7 % ; aditivos inocuos a las concentraciones usadas, necesarios para un funcionamiento óptimo.

ATENCIÓN: Nocivo en caso de ingestión.

Uso
Para teñir los geles después de la electroforesis de proteínas y la inmunofijación posterior.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Las soluciones de colorante concentrada y diluida pueden conservarse a temperatura ambiente o en nevera, en contenedores cerrados para evitar la evaporación. La solución concentrada es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial de colorante.
La solución diluida es estable durante 1 mes. El período de estabilidad puede prolongarse a 3 meses si la solución diluida se conserva en nevera. Es imperativo colocar el contenedor cerrado en nevera inmediatamente después de cada uso.
No almacene la solución de colorante diluida cerca de una fuente de calor.
El diluyente del colorante concentrado puede conservarse a temperatura ambiente o en nevera. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit o en la etiqueta del vial del diluyente del colorante. NO LO CONGELE.

4. FLUIDIL

Preparación
El Fluidil (SEBIA, PN 4587, 1 vial, 5 mL) está listo para su uso.

Uso
Para diluir muestras viscosas o turbias, por ejemplo, sueros que contengan crioglobulina o criogel.

Almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro
Almacénelo a temperatura ambiente. Es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial de Fluidil.
El Fluidil debe estar exento de precipitados.

EQUIPAMIENTO Y ACCESORIOS NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Fuente de alimentación: MG 300 SEBIA, PN 1302 ó MG 500 SEBIA, PN 1303.
2. APLICADOR HYDRAGEL K20 SEBIA, PN 1409, que contiene el soporte del aplicador HYDRAGEL K20 y la plantilla de aplicación de reactivos 1 IF.
3. Cámara de Almacenaje Húmeda, PN 1270.
4. Cubeta de electroforesis: K20 SEBIA, PN 1400.
5. Tanques y Soportes de Geles para el procesamiento de los geles: Kit de Accesorios HYDRAGEL K20 SEBIA, PN 1420.
6. Pipetas: 10 µL, 20 µL, 100 µL y 200 µL.
7. Estufa-Secador: IS 80 SEBIA, PN 1430.

MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS

Extracción y conservación de las muestras
Se recomienda analizar muestras frescas. Los sueros deben obtenerse según los procedimientos establecidos de uso en el laboratorio clínico. Refrigere las muestras (2 a 8 °C) tan pronto como sea posible después de su obtención, durante una semana como máximo. Para períodos de conservación más prolongados congele las muestras (así son estables un mes por lo menos).
Congelar las muestras de suero con azida sódica 0,02 g/dL mejora la estabilidad del almacenaje.

IMPORTANTE: No utilice ácido bórico como conservante.

Las muestras descongeladas pueden dar lugar a ligeras marcas de aplicación debidas a la desnaturalización de proteínas o lipoproteínas.

Preparación de las muestras
Diluya el suero antes de la aplicación para evitar el efecto prozona que se da a altos niveles de antígeno y mézclelo bien.

CARRIL	SUERO (µL)	DILUYENTE (µL)
Carril de inmunofijación de Ig G	20	100
Carril de referencia ELP y el resto de carriles de inmunofijación	30	60

Casos especiales

- Si la tasa de inmunoglobulinas es superior a 20 g/L (caso de hipergammaglobulinemia), se recomienda aumentar el factor de dilución de las muestras (excepto para el recorrido ELP), con el fin de obtener una concentrasción normal de inmunoglobulinas.
- Si la tasa de inmunoglobulinas es inferior a 5 g/L (caso de hipogammaglobulinemia), se recomienda disminuir el factor de dilución de las muestras.
- Para la investigación de cadenas ligeras libres séricas o urinarias, se recomienda utilizar la técnica " BENCE JONES ".
  Para ello, el test podrá realizarse con el kit IF y con los antisueros ANTI-KAPPA LIBRE (SEBIA, referencia N° 4610) y ANTI-LAMBDA LIBRE (SEBIA, referencia N° 4611) o con el kit HYDRAGEL BENCE JONES K20 (SEBIA, referencia N° 3038).
  En caso de búsqueda de cadenas libres séricas, diluir la muestra en suero fisiológico, o en diluyente para inmunofijación prediluido a 1/4 (1 volumen de diluyente + 3 volúmenes de agua destilada o desmineralizada), a 1/10 para los recorridos ELP, GAM, K y L (1 volumen de muestra + 9 volúmenes de diluyente prediluido o suero fisiológico) y a 1/3 (1 volumen de muestra + 2 volúmenes de diluyente prediluido o suero fisiológico) para los recorridos revelados con antisueros anti-kappa libre y anti-lambda libre.
  Si la tasa de inmunoglobulinas es inferior a 5 g/L, se recomienda diluir menos la muestra; por ejemplo a 1/5 para los recorridos ELP, GAM, K y L, y a 1/2 para los recorridos Kl y Ll.

- Después de refrigerarlos o congelarlos, algunos sueros (especialmente aquellos que contengan crioglobulina o criogel) pueden volverse viscosos o desarrollar turbidez. Tales sueros pueden presentar problemas de aplicación debidos a la difusión dificultada a través de los dientes del aplicador de muestras. En tal caso, añada 25 µL de Fluidil a 75 µL de suero y agítelo en el vórtex durante 15 segundos. Siga entonces con el procedimiento usual.
- Algunas proteínas monoclonales pueden polimerizar dando lugar a una "fracción monoclonal" que aparece en todos los carriles inmunofijados. En este caso (i) prepare una solución al 1 % de beta-mercaptoetanol en Fluidil, (ii) añada 25 µL de esta solución reductora a 75 µL de suero neto, (iii) agite la mezcla en el vórtex y espere 15 minutos como mínimo (máximo 30 minutos) y continúe entonces con el procedimiento habitual.
- Para análisis de Ig D y/o de Ig E, aplicar las mismas diluciones que para las cadenas ligeras libres y ligadas.

Muestras a descartar

- No utilice muestras de plasma. El fibrinógeno da lugar a una banda en el carril de referencia en la fracción gamma que puede ser tomada por una proteína monoclonal.
- No utilice muestras hemolizadas.

PROCEDIMIENTO

I. MIGRACIÓN

1. Coloque el soporte del aplicador HYDRAGEL K20 en una superficie plana (Fig. 1) y eleve la parte del soporte del aplicador con las muescas numeradas.
2. Dispense 120 µL de agua destilada o desionizada en el tercio inferior del marco impreso en el soporte del aplicador HYDRAGEL K20.
3. Saque el gel de agarosa HYDRAGEL de su envoltorio.
4. Extienda un papel de filtro fino de manera rápida y uniforme sobre la superficie del gel para absorber el exceso de líquido. Retire el papel inmediatamente.

   ADVERTENCIA: Para evitar que se deshidrate, no deje que el papel de filtro contacte con el gel durante mucho tiempo.
5. Ponga el gel (con el lado de agarosa hacia arriba) con su borde inferior contra el tope situado debajo del marco impreso (Fig. 2).
6. Doble el gel y haga que contacte con el agua (Fig. 2). Asegúrese de que no se formen burbujas de aire, de que el agua esté extendida bajo toda la superficie del gel y de que éste esté alineado con el marco impreso.
7. Baje el soporte del aplicador con las muescas numeradas hasta la posición intermedia con la rueda giratoria en posición elevada.
8. Ponga una aplicador en una superficie plana con los números de los pocillos hacia arriba (Fig. 3).
9. Aplique 10 µL de suero diluido correctamente en los pocillos del aplicador como sigue. Cargue el aplicador en menos de 2 minutos.

CARRIL DE INMUNOFIJACIÓN	POCILLO No
ELP	1
G	2
A	3
M	4
K	5
L	6

   - Use el aplicador sin demora.
   - Para un uso posterior (hasta 8 horas después), coloque el aplicador en la cámara de almacenaje húmeda con los dientes hacia arriba [cójalo por el marco protector de plástico de los dientes], guarde la cámara entera refrigerada y prepare el gel en el soporte del aplicador HYDRAGEL K20 justo antes de usarlo.

     Consulte la hoja de instrucciones de la cámara húmeda para más detalles.
10. Rompa el marco protector de los dientes del aplicador.
11. Coloque el aplicador de muestra en la posición No. 6 del soporte del aplicador.

    IMPORTANTE: Los números impresos en el aplicador de muestra deben quedar de cara al usuario (Fig. 4).
12. Baje el soporte del aplicador hasta que el aplicador contacte con la superficie del gel. NO FUERCE LOS SOPORTES HACIA ABAJO.
13. Cuando haya pasado 1 minuto, gire la rueda giratoria para elevar el aplicador, saque el aplicador y deséchelo.
14. Ponga el gel en una cubeta de electroforesis apropiada, de acuerdo con la polaridad indicada en el gel. Al usar la cubeta SEBIA K20, coloque el HYDRAGEL en el puente con el lado de agarosa hacia abajo ; el gel debe sumergirse en el tampón alrededor de 1 cm por cada lado.

    Consulte la hoja de instrucciones de la cubeta K20 para más detalles.
15. Conecte la cubeta a la fuente de alimentación.

CONDICIONES DE MIGRACIÓN	SEBIA K20
Volumen de tampón por compartimento	150 mL
Volumen total de tampón	300 mL
Tiempo de migración	20 minutos
Voltaje constante	100 V
Corriente inicial (un gel)	16 ± 3 mA

14. Después de la migración, desconecte la cubeta y saque el gel.
    El marcador azul debe estar situado a unos 5 mm del lado anódico del marco impreso.

II. IMMUNOFIJACIÓN

1. Coloque el soporte del aplicador HYDRAGEL K20 en una superficie plana.
2. Dispense 120 µL de agua destilada o desionizada en el tercio inferior del marco impreso en el soporte del aplicador HYDRAGEL K20.
3. Ponga el gel (con el lado de agarosa hacia arriba) con su borde contra el tope situado debajo del marco impreso (Fig. 2).
4. Doble el gel y haga que contacte con el agua (Fig. 2). Asegúrese de que no se formen burbujas de aire, de que el agua esté extendida bajo toda la superficie del gel y de que éste esté alineado con el marco impreso.

5. Prepare la plantilla de aplicación de reactivos 1 IF como sigue (Fig. 5):
   - Coloque la plantilla de aplicación en las horquillas de sujeción.
   - Sostenga la solapa de la plantilla y haga descender la plantilla sobre el gel.
   - Los canales de la plantilla deben estar perfectamente alineados con las huellas de los dientes del aplicador que han quedado en el gel.
6. Aplique los reactivos como sigue:

CANAL	VOLUMEN (µL)	REACTIVO	COLOR
ELP	40	solución fijadora	amarillo
G	25	antisuero anti-cadenas pesadas gamma	rosa
A	25	antisuero anti-cadenas pesadas alfa	azul oscuro
M	25	antisuero anti-cadenas pesadas mu	verde amarillento
K	25	antisuero anti-cadenas ligeras kappa (libres y unidas)	verde claro
L	25	antisuero anti-cadenas ligeras lambda (libres y unidas)	azul claro

NOTA: Para evitar confusiones, los colores de los reactivos aparecen tanto en las etiquetas del vial como en los pocillos de la plantilla de aplicación.

- *Aspire los reactivos sin atrapar burbujas de aire en la punta de la pipeta.*
- *Aplique los reactivos (Fig. 6):*
- *Sostenga la pipeta verticalmente y apoye su punta suavemente en el fondo del pocillo.*
- *Dispense el reactivo de manera que se extienda por el canal sin que se formen burbujas de aire.*

7. Incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.

III. ELIMINACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Elimine el exceso de reactivos con el peine de papel de filtro (Fig. 7).
2. Elimine los reactivos en menos de 30 segundos.
   - IInserte el peine formando un ángulo de 30° en las ranuras del extremo inferior de los canales de la plantilla de forma que los dientes toquen el lado vertical más alejado del operario.
   - Permita que los dientes contacten suavemente con el líquido inclinando cada peine un ángulo de 45°, permitiendo así que los dientes absorban el líquido (Fig. 8).

   IMPORTANTE: El peine debe permanecer inclinado (45°). Si se pone recto podría dañar el gel.

IV. ELIMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS NO PRECIPITADAS

1. Saque el peine.
2. Compruebe que los reactivos se han absorbido bien, lo que es indicado por:
   - la ausencia de reactivos sobre el gel.
   - toda la extensión de los dientes está teñida.
     Si la absorción de los reactivos es incompleta, inserte de nuevo el mismo peine de papel de filtro (en la misma posición) y repita manualmente el procedimiento de eliminación.
3. Coja la plantilla de aplicación de reactivos por la solapa, elévela y sáquela.
4. Aplique un papel de filtro grueso sobre el gel durante 4 minutos. El papel de filtro grueso debe contactar con el gel de forma uniforme.

   ATENCIÓN : Asegurarse de apoyar correctamente toda la superficie de la hoja de papel de filtro, para conseguir un perfecto contacto entre el gel y el papel.
5. Retire el papel de filtro. Lave el gel verticalmente en salina durante 5 minutos. Coloque el gel de manera de que el carril ELP esté situado en la parte inferior del soporte del gel.
6. Ponga el gel en una superficie plana.
7. Coloque un nuevo papel de filtro grueso sobre el gel. El papel de filtro grueso debe contactar con el gel de forma uniforme.
8. Seque el gel completamente en la estufa-secador IS 80 a 80 °C hasta que el papel de filtro esté completamente seco (unos 7 minutos) o, si no dispone de la estufa-secador IS 80, deje el papel de filtro en contacto uniforme con el gel durante 5 minutos y seque el gel completamente con aire caliente.
9. Limpie la plantilla de aplicación con un cepillo pequeño (por ejemplo, un cepillo de dientes). NO UTILICE ALCOHOL O DISOLVENTES. Asegúrese de que la plantilla esté completamente seca antes de volver a usarla ; elimine las gotitas de agua de los pocillos golpeando ligeramente la plantilla sobre papel suave.

V. TINCIÓN Y DECOLORACIÓN

1. Después del secado, sumerja el gel completamente seco verticalmente en salina durante 3 minutos.
2. Sumérjalo después verticalmente en la solución de tinción durante 4 minutos.
3. Decolore en tres baños sucesivos de solución decolorante hasta que la coloración de fondo sea completamente incolora y clara.
4. Seque el gel en una corriente de aire a 80 °C. Si es necesario, limpie el reverso del gel (el lado de soporte de plástico) con un papel suave humedecido.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda analizar un suero control (como el Control IT / IF SEBIA, referencia nº 4788) después de cada cambio de lote de uno de los reactivos.

RESULTADOS

Interpretación

Ausencia de componente monoclonal

- Una muestra de suero normal presenta una tinción leve y difusa de las inmunoglobulinas policlonales en todos los carriles.
- Una hipergammaglobulinemia se caracteriza por una zona difusa fuertemente teñida y por la ausencia de bandas claramente definidas.

Presencia de un componente monoclonal

- La presencia de una proteína monoclonal (gammapatía) se caracteriza por la presencia de una banda monoclonal detectada con uno de los antisueros anti-cadenas pesadas (gamma, alfa o mu) y con cualquiera de los antisueros anti-cadenas ligeras kappa o lambda. La banda monoclonal detectada, normalmente de apariencia definida y demarcada, debe estar localizada a la misma distancia de migración que la banda monoclonal sospechosa que aparece en el carril de referencia (ELP).

- La ausencia de reacción con una de las anti-cadenas pesadas aplicadas, pero con presencia de una cadena ligera, puede significar:
  a) Presencia de una gammapatía Ig D ó Ig E que es conveniente confirmar con anti-cadenas pesadas delta o épsilon.
  b) La presencia de una cadena ligera libre que es conveniente confirmar con los antisueros específicos anti-cadenas ligeras libres kappa o lambda.
- El no observar una reacción positiva con cualquiera de los antisueros anti-cadenas ligeras aplicados, mientras un antisuero anti-cadenas pesadas reacciona, podría indicar una muy poco frecuente gammapatía de cadenas pesadas (gamma, alfa o mu).

Presencia de dos o más componentes monoclonales

En casos excepcionales, varios clones de células B proliferan, lo que es indicado por varias bandas monoclonales reveladas mediante la inmunofijación:

- Una gammapatía biclonal se caracteriza por la presencia de dos bandas de cadenas pesadas (idénticas o diferentes) y dos bandas de cadenas ligeras (idénticas o diferentes).
- Las inmunoglobulinas polimerizadas se caracterizan por la presencia de varias bandas del mismo tipo de cadena pesada y una del mismo tipo de cadena ligera. Para confirmar la presencia de una única anomalía monoclonal, es necesario despolimerizar con beta-mercaptoetanol y repetir la inmunofijación (consulte "MUESTRAS PARA EL ANALISIS").
- Una gammapatía oligoclonal se caracteriza por la presencia de múltiples bandas de uno o más tipos de cadenas pesadas y por uno o dos tipos de cadenas ligeras.

Casos especiales

- Cuando una banda de tipo monoclonal se observa en la electroforesis de suero (carril ELP) pero no es confirmada por la inmunofijación, el fibrinógeno (muestra de plasma) debería ser el primer sospechoso.
- Cuando una banda de tipo monoclonal se observa en todos los carriles de inmunofijación, debe sospecharse la existencia de crioglobulina o Ig M polimerizada. Despolimerice con un agente reductor y repita el procedimiento (consulte "MUESTRAS PARA EL ANALISIS").

Limitaciones

Vea **MUESTRAS PARA ANILISIS**.

La utilización de antisueros distintos a los especificados para la técnica de inmunofijación realizada con la plantilla estándar puede afectar a la calidad de los resultados.

Teniendo en cuenta los principios analíticos de las técnicas actuales (principios de la electroforesis de zona, resolución y sensibilidad), no puede darse ninguna garantía respecto a la detección de la totalidad de todos los componente monoclonales.

Resolución de problemas

Llame al Servicio de Atención Técnica de su distribuidor cuando la prueba no funcione pese a haber seguido cuidadosamente las instrucciones para la preparación y el almacenaje de los materiales y para el procedimiento.

Las hojas de seguridad de los diferentes reactivos del kit, así como las informaciones relativas a la eliminación de los desechos, están disponibles en el Servicio de Asistencia Técnica de su distribuidor.

CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS

Se utilizaron materiales, preparación de la muestra y procedimientos estándar. Todas las electroforesis fueron evaluadas visualmente.

Reproducibilidad intrageles (intraserial) y especificidad

La reproducibilidad intrageles fue demostrada con dos muestras de suero patológicas con un nivel bajo y elevado de componente monoclonal respectivamente, y con una muestra con dos componentes monoclonales. Cada muestra se analizó en 2 geles procedentes de 2 lotes usando el procedimiento de tinción con violeta ácido.

Todas las muestras analizadas proporcionaron resultados idénticos con los 2 lotes, mostrando los patrones típicos y según lo esperado para el tipo de muestra analizado, detectándose bandas monoclonales mediante inmunofijación en cada muestra de suero.

Reproducibilidad intergeles (interserial) y especificidad

La reproducibilidad intergeles fue demostrada con dos muestras de suero patológicas con un nivel bajo y elevado de componente monoclonal respectivamente. Cada muestra se analizó en 20 geles procedentes de 2 lotes usando el procedimiento de tinción con violeta ácido.

Todas las muestras analizadas proporcionaron resultados idénticos con los 2 lotes mostrando los patrones típicos y según lo esperado para el tipo de muestra analizada, con una banda monoclonal detectada mediante inmunofijación en cada muestra de suero.

Exactitud

Treinta y dos muestras de suero patológicas diferentes fueron analizadas usando el kit HYDRAGEL IF K20 y otro sistema comercial de inmunofijación en geles de agarosa. El procedimiento HYDRAGEL IF K20 fue probado con el procedimiento de tinción con violeta ácido. Se detectaron bandas idénticas en todas las muestras patológicas con cada sistema.

Sensibilidad

Se prepararon diluciones seriales con 3 muestras de suero patológicas que presentaban componentes monoclonales y se analizaron con el procedimiento HYDRAGEL IF K20 usando el procedimiento de tinción tanto con violeta ácido como con negro amido.

Los resultados están resumidos debajo.

	COMPONENTE MONOCLONAL		LÍMITE DE DETECCIÓN (g/L)	
MUESTRA No.	TIPO	CONC. (g/L)	VIOLETA ACIDO	NEGRO AMIDO
1	alfa	5.33	0.25	0.25
1	kappa		0.25	0.25
2	mu	10.9	0.12	0.12
2	lambda		0.25	0.25
3	gamma	17.2	0.25	0.50
3	lambda		0.12	0.12

BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAPHY

Pour des informations complémentaires sur l'interprétation des profils obtenus par immunofixation, voir (1) et (2):
For additional information on interpretation of immunofixation patterns refer to 1. and 2.:

1. Le Carrer Didier, "Électrophorèse des Protéines et Immunofixation : Guide d'interprétation", Laboratoires SEBIA, 1994, Hatier - Paris.
2. Keren D. F., "High Resolution Electrophoresis and Immunofixation Techniques and Interpretation", Butterworth-Heinemann, Woburn, Ma, USA, 2nd ed., 1994, 397 pp.
3. Wendling A. Procédures de diagnostic ou de dépistage : Justification et validité d'un test de diagnostic ou de dépistage, sensibilité, spécificité. *Impact-Internat*, 1986, Sept : 93-97.

SCHÉMAS / FIGURES

Figure 1

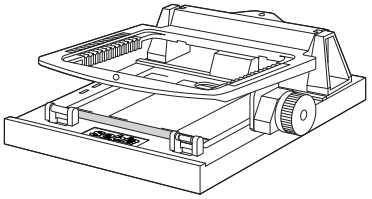


Figure 2

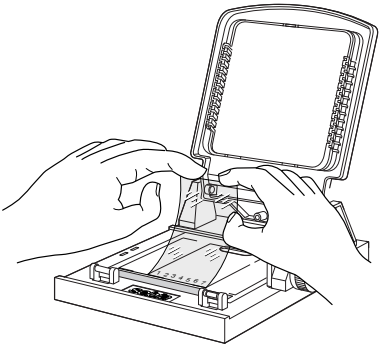


Figure 3

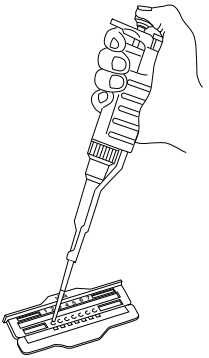


Figure 4

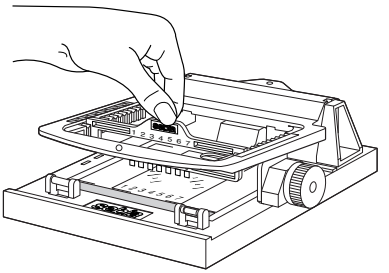


Figure 5

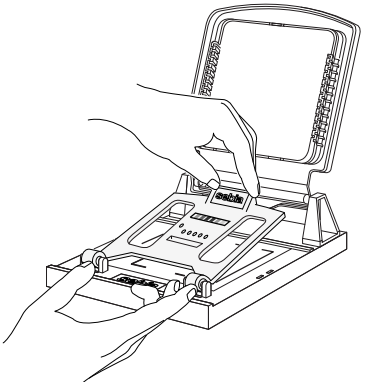
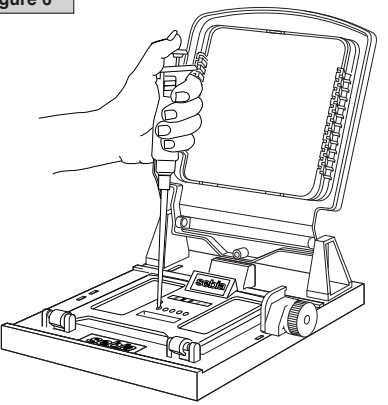


Figure 6



SCHÉMAS / FIGURES

Figure 7

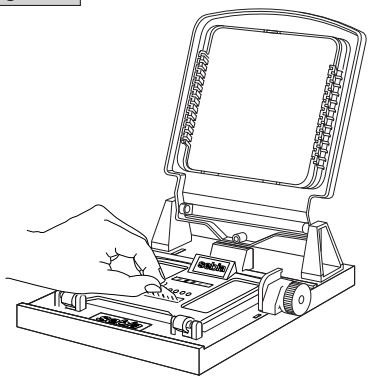
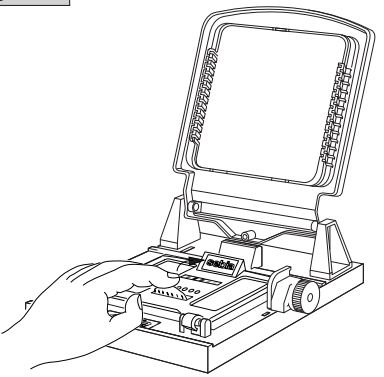



Figure 8