

Alfa 2 macroglobulina:	170-450 mg/dl.
Apolipoproteína A-1:	73-169 mg/dl.
Apolipoproteína B:	58-138 mg/dl.
Alfafetoproteína:	0-10 ng/ml.
PCR:	0.007-0.8 mg/dl.

Valores de referencia para inmunoglobulinas séricas

Edad	IgA mg/dl	IgG mg/dl	IgM mg/dl
Recién nacidos	menor de 10	700-1400	0-20
5 días-1 mes	5-30	400-1250	10-60
1-2 meses	8-55	230-900	13-77
2-3 meses	16-88	190-670	13-83
4-6 meses	18-80	260-880	15-92
6 meses-1 año	20-100	250-1100	16-100
1-2 años	22-130	350-1200	18-107
2-3 años	26-150	530-1220	20-108
3-9 años	30-240	610-1380	20-134
9-15 años	60-300	630-1400	30-148
Adultos	90-310	710-1520	40-250

Valores obtenidos en individuos presuntamente sanos de nuestra población utilizando placas y sueros controles Diffu-Plate.

Bibliografía

- 1) Berne, G.H. 1974. *Clin. Chem.* 200, 61-89.
- 2) Fahay, J. L. and McKelvey, E. M., 1965, *J. Immunol.* 94-84.
- 3) Heremans, J. P., and Masson, P. L., 1973, *Clin. Chem.* 19:294-300.
- 4) Hosty, R. A., Hollenbech, M., and Shane, S. *Clin. Chem.* 19:524-526.
- 5) Mancini, H. S., Carbonara, A. O., Heremans, J. F., 1965, *Immunochemistry* 2: 235.
- 6) Palmer, D. F., Woods, R. 1972. *Immunology Series n°3, Dept. Of Health Education and Welfare, Publication n° (HSM)72-8102, Center for Disease Control, Atlanta, GA.*
- 7) Rowe, D. E., Grob, Anderson, S. 1972 *WHO*, 46-67.
- 8) Verbruggen, R., 1975. *Clin. Chem.* 21: 5-43.

APR-0000

 **Biocientífica S.A.**



Elaborado por: BIOCIENTIFICA S.A.
Iturri 232 (C1427ADD) Buenos Aires - Argentina
Tel.: 54-11-4857-5005 - Fax: 54-11-4857-1004
Director Técnico: Héctor M. Quiroz; Bioquímico Farmacéutico
Producto de diagnóstico de uso in vitro autorizado por MS y AS
Disp. 3754/99



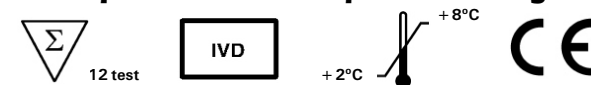
Representante autorizado: M.T. PROMEDT CONSULTING
GmbH
Eisenbahnstrasse 2
D-66386 St. Ingbert
Tel: +49 6894 581020 - Fax: +49 6894 581021

6

 **Biocientífica S.A.**

DIFFU-PLATE

Placas de inmunodifusión radial para la determinación de inmunoglobulinas y otras proteínas en líquidos biológicos.



Instrucciones generales para el uso de las placas de inmunodifusión radial (IDR).

Uso del equipo

La IDR en placa de agarosa conteniendo antisueros específicos constituye un excelente recurso diagnóstico para la determinación cuantitativa de proteínas en líquidos biológicos dentro del rango indicado en la Tabla de Referencia. Para concentraciones fuera de este rango, las muestras a ensayar deben ser concentradas o diluidas apropiadamente (ver sección "Preparación de material").

Presentación de los equipos

Placas de inmunodifusión radial para 12 determinaciones conteniendo antisuero específico para la proteína a estudiar.

Instrucciones para la conservación

Las placas se conservan entre 2° y 8°C en su envase original hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta. Deben almacenarse en lugares planos e invertidas para evitar el acúmulo de agua de condensación en la superficie a sembrar. No deben congelarse.

Una vez abiertas y si fueron parcialmente usadas, pueden reutilizarse en posteriores determinaciones, siempre y cuando sean colocadas nuevamente en el envase de aluminio, evitando el contacto con el aire, y conservadas entre 2°- 8°C. Para evitar la deshidratación del gel, colocar gasa o algodón humedecido en el centro de la placa y luego cerrar firmemente. Si pasaron más de 4 semanas desde el primer uso, se debe trazar una nueva curva de calibración ya que no corresponde usar los valores indicados en la Tabla de Referencia.

Principio del método

El procedimiento consiste en una inmunoprecipitación en agarosa entre un antígeno a cuantificar y su anticuerpo homólogo. Se realiza incorporando uno de los dos reactivos inmunes (generalmente el anticuerpo) uniformemente en una capa de agarosa y luego introduciendo el otro reactivo en pocillos cavados en el gel. El antígeno difunde radialmente en la mezcla gel-anticuerpo y se forma un disco o anillo visible en

4-03

1

5

un punto que depende de la relación estequiométrica antígeno-anticuerpo. A medida que más antígeno difunde, el anillo se redissuelve y reaparece a una distancia mayor del pocillo. Este aumento en el diámetro de precipitación continúa hasta que antígeno y anticuerpo reaccionan completamente.

Mientras que el precipitado se está expandiendo (16 a 20 horas) la relación entre el diámetro del anillo y el logaritmo de la concentración de antígeno es aproximadamente lineal. Al completarse la reacción, la relación entre el diámetro al cuadrado y la concentración es lineal.

El sistema Diffu-Plate permite el desarrollo de 3 métodos para el análisis de los resultados ya sea en:

- A- Determinaciones de rutina.
- B- Determinaciones de alta precisión.
- C- Determinaciones de rápida orientación.

Equipamiento necesario para el desarrollo de la técnica

- 1- Placa IDR para 12 determinaciones.
- 2- Micropipetas o capilares que permitan medir 5 µl con precisión.
- 3- Sueros testigos con 1 y/o 3 niveles de la proteína a determinar.
- 4- Regla de lectura que permita leer con una precisión de 0.1 mm.
- 5- Tabla de conversión diámetro vs. concentración (uso opcional).

Procedimiento

Preparación del material

1- Sueros controles: se pueden presentar en un único nivel de concentración o en viales de alta, media y baja concentración. Contiene azida sódica al 0.1% (evitar su ingestión y contacto con la piel o mucosa). Son estables hasta su fecha de vencimiento si se conservan entre 2° y 8°C. La concentración de proteína específica fue obtenida por comparación con estándares nacionales e internacionales. Cada calibrador tiene características físico-químicas similares a la del suero humano. Un índice de posible deterioro es la presencia de material particulado o una gran desviación de los valores esperados respecto de los valores informados en la Tabla de Referencia.

NOTA: todos los materiales usados en este equipo fueron testeados y resultaron negativos para HIV y HBsAg; sin embargo ninguno de estos ensayos garantiza la ausencia absoluta de agentes infecciosos; por lo tanto se sugiere que se manipulen en forma apropiada por personal capacitado.

2- Muestras: las muestras de suero deben procesarse en el día. En caso contrario, conservar a -20°C evitando congelar y descongelar. Si aparece turbidez, clarificar por centrifugación. Otros materiales biológicos se centrifugan y procesan igual que el suero. Las muestras de sueros pueden necesitar ser diluidas para entrar en el rango de resolución de la placa, para

ello utilizar solución fisiológica. En el caso de muestras pediátricas la concentración generalmente es menor, por lo tanto deben concentrarse las muestras al doble o bien realizar 2 siembras en un período máximo de 30 minutos. Dejar secar después de la primera siembra.

3- Placas: úselas en un área libre de polvo para evitar la contaminación.

Desarrollo de la reacción

- 1- Abrir la placa para permitir que se evapore el exceso de humedad, si lo hubiera.
- 2- Sembrar 5 µl de muestra o control utilizando micropipetas de precisión. Colocar en el centro de la placa algodón o gasa humedecida, para mantener la humedad del agar. Cerrar firmemente la tapa.
- 3- Incubar en posición invertida en cámara húmeda el tiempo indicado en la Tabla en el punto Tiempo de Incubación, a temperatura ambiente.

Lectura de los resultados

El punto final de la difusión está indicado por la aparición de un anillo de bordes netos. El mismo se alcanza una vez cumplido el tiempo de incubación. A partir de ese momento puede efectuarse la lectura, ya que el halo no aumentará de tamaño.

El cálculo de los resultados se realiza con alguno de los siguientes métodos:

A- Determinación de rutina utilizando tabla de valores.

- a) Medir los halos con una precisión de 0.1 mm.
- b) Interpolarse el dato anterior en la tabla de valores que acompaña a cada placa.

B- Determinación de alta precisión trazando curva de calibración.

- a) Las tres primeras posiciones de cada placa se utilizan para sembrar las diferentes diluciones o concentraciones de los sueros controles.
- b) Medir los diámetros de halo con una precisión de 0.1 mm.
- c) Graficar las concentraciones de los sueros de referencia contra el diámetro al cuadrado de los halos de precipitación.
- d) Trazar la recta que mejor una a los tres puntos.
- e) Interpolarse el valor de la muestra desconocida.

C- Determinación de rápida orientación. Método cinético de lectura rápida.

- a) Tomar la lectura entre 16 y 20 horas de incubación con una diferencia máxima de 30 minutos respecto del suero de referencia. Los diámetros de las zonas de precipitación deben medirse con una precisión de 0.1 mm por lo menos.
- b) Graficar los diámetros de los sueros de referencia contra el logaritmo de sus respectivas concentraciones.
- c) Trazar la recta que mejor una a los tres puntos.
- d) Interpolarse el valor de la muestra desconocida.

e) No es necesario trazar una curva cada vez que se procesa una nueva muestra. Sin embargo, debe efectuarse la lectura en el mismo tiempo en que se leyeron los sueros de referencia. Si se efectúa una nueva siembra con más de una semana de diferencia respecto a la calibración es recomendable introducir un testigo en cada corrida.

NOTA: la tabla de valores se confecciona sobre un gran número de placas de cada lote utilizando un programa estadístico por computación para trazar la mejor recta. Sólo es válida para el número de lote indicado. Variaciones en los parámetros del ensayo, como volumen de muestras, temperatura, tiempo de incubación y utilización de la placa una vez abierta por un lapso superior a 1 mes pueden producir diámetros no concordantes con los especificados en la tabla. Es recomendable incluir sueros controles para trazar una curva de calibración.

Errores factibles en la utilización de la técnica

- 1- Debe tenerse suma precaución al sembrar, evitando derramar muestra fuera del pocillo, romper los bordes del mismo o introducir burbujas de aire. En caso que esto ocurra, sembrar un nuevo pocillo.
- 2- Si una vez abierta la placa se observan signos de deshidratación o deterioro en el agar, debe ser desechada.
- 3- Deben evitarse las variaciones bruscas de temperatura, ya que afectan la velocidad de difusión y, por lo tanto, los diámetros de precipitación.
- 4- Las placas no deben ser congeladas. Si esto ocurriera, deben ser descartadas.

Evaluación de los resultados

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. Los rangos que aquí se dan corresponden a pacientes ambulatorios presuntamente sanos.

*Inmunoglobulina G: Adultos: 600-1650 mg/dl.
Niños: 560-1500 mg/dl.*

*Inmunoglobulina A: Adultos: 90-400 mg/dl.
Niños: 100-210 mg/dl.*

*Inmunoglobulina M: Adultos: 75-300 mg/dl.
Niños: 40-200 mg/dl.*

IgD: 1-4.5 mg/dl.

C-3: 80-160 mg/dl.

C-4: 20-40 mg/dl.

Ceruloplasmina: 19-57 mg/dl.