

# НАБОР ИФА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ $\beta_2$ -МИКРОГЛОБУЛИНА В МОЧЕ ИЛИ СЫВОРОТКЕ

## ORG 5BM, $\beta_2$ -Microglobulin

Каталог. № : **ORG 5BM**  
Количество : **96**  
Производитель: **ORGENTEC**  
**Diagnostika GmbH, (Германия)**

Методика от **01-2011**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор использует принцип непрямого твердофазного ИФА - ELISA. Он разработан для количественного определения  $\beta_2$ -микроглобулина в сыворотке, плазме или моче человека. Анализ предназначен только для диагностики in-vitro для диагностики лимфатических заболеваний и заболеваний почек.

### КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Белки, проходящие клубочковую базальную мембрану, подлежат дифференцированной фильтрации. Проницаемость обратно пропорциональна молекулярному весу (альбумин около 0,6%, миоглобин около 75%). Тем не менее, только минимальные количества белков определяются в моче, поскольку большее их количество реабсорбируется в канальцах. Повышенная гломерулярная проницаемость белков и высокая канальцевая элиминация белков могут быть дифференцированы по молекулярному весу выделенных белков.

Паттерн элиминированных белков в моче дает информацию о:

- повышенном выделении белков;
- предварительной диагностике заболеваний почек;
- дифференциации протеинурии;
- гломерулярной или канальцевой протеинурии.

Диагностически значимые протеины: IgG (150 kDa); альфа-1-микроглобулин (33 kDa); ретинолсвязывающий белок (21 kDa); альбумин (66 kDa);  $\beta_2$ -микроглобулин (12 kDa); легкие цепи иммуноглобулинов (белок Бенс-Джонса, 22 kDa).

$\beta_2$ -микроглобулин с молекулярным весом 12 kDa принадлежит к легкой цепи к части мембран-связывающих HLA антигенов. Он состоит из двух полипептидных цепей, тяжелой – с антигенными структурами и легкой. Определение  $\beta_2$ -микроглобулина в сыворотке и плазме определяется для диагностики активации клеточной иммунной системы и как онкомаркер.  $\beta_2$ -микроглобулин в моче – как индикатор нарушения фильтрации.

$\beta_2$ -микроглобулин синтезируется в лимфатической системе. При множественной миеломе, болезни Ходжкина, хроническом лимфолейкозе и других злокачественных неходжкинских лимфомах, увеличенные концентрации определяются в связи с увеличенным биосинтезом в клетках. В этих случаях уровни  $\beta_2$ -микроглобулина являются индикатором развития болезни и эффективности терапии. Другие заболевания с активацией клеточного иммунитета сопровождаются повышением  $\beta_2$ -микроглобулина в сыворотке тоже.

В почках  $\beta_2$ -микроглобулин фильтруется в клубочках и реабсорбируется в канальцах. Молекула нестабильна в моче при кислом pH на протяжении времени. Определение  $\beta_2$ -микроглобулина в сыворотке и моче позволяет дифференцировать активацию лимфатической системы от нарушений почечной функции.

Назначение: Для определения изменений клубочковой и канальцевой фильтрации; канальцевого поражения тяжелыми металлами (Cd, Hg); лимфатических заболеваний; отторжения почечного трансплантата.

### ПРИНЦИП ТЕСТА

Высокоочищенный античеловеческий  $\beta_2$ -микроглобулин привит к микрочайкам.  $\beta_2$ -микроглобулин, если присутствуют в разбавленной сыворотке или плазме или моче, связываются с соответствующим антителом. Промывание микрочайек удаляет неспецифические компоненты сыворотки или плазмы. Античеловеческий  $\beta_2$ -микроглобулин, конъюгированный пероксидазой хрена иммунологически связывается с связанным  $\beta_2$ -микроглобулином

пациента, формируя конъюгат-антитело-антиген комплекс. Промывание микрочайек удаляет несвязанный конъюгат. Энзимный субстрат при присутствии связанного конъюгата гидролизуется до формирования голубого окраса. Добавления кислоты останавливает реакцию, формируя желтый конечный продукт. Интенсивность этого желтого цвета фотометрически измеряется при 450 нм. Количество окраса прямо пропорционально концентрации  $\beta_2$ -микроглобулина, присутствующего в образце.

### ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Все реагенты набора предназначены строго для диагностики *in vitro*.
2. Не смешивайте компоненты наборов из различных лотов.
3. Компоненты, содержащие человеческую сыворотку, были протестированы и найдены отрицательными к Вирусу Гепатита В, Гепатита С, ВИЧ 1 и ВИЧ 2. Тестируемые методы были одобрены FDA. Однако, ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами сыворотки следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
4. Избегайте контакта с ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидином). Если ТМБ попал на кожу, тщательно вымойте водой с мылом.
5. Стоп раствор содержит соляную кислоту. Если раствор попал на кожу, тщательно промойте водой и обратитесь к врачу.
6. Некоторые компоненты набора (напр. Контроли, буфер образцов и буферный моющий раствор) содержат азид натрия в качестве консерванта. Азид натрия является высоко токсичным и реактивным в чистой форме. При концентрации в продукте, тем не менее, не опасен. Вопреки классификации как неопасный, мы настоятельно рекомендуем использовать обычные правила безопасности (8,9,10).
7. Некоторые наборы содержат Проклин 300 в качестве консерванта. При уничтожении реагентов, содержащих проклин 300, промойте большим количеством воды для разбавления компонентов до ниже активного уровня.
8. Используйте перчатки при работе с образцами и реагентами и тщательно мойте руки после работы.
9. Не пипетируйте ртом.
10. Не ешьте, не пейте, не курите или не применяйте косметику в местах работы с образцами или реагентами набора.
11. Не допускайте контакта между буферным раствором перекиси и легко окисляемыми материалами: повышенная температура может вызывать спонтанное возгорание.

Придерживаться установленных правил для проведения контроля качества в медицинских лабораториях путем анализа контролей и/или объединенной сыворотки. При работе со всеми реагентами, контролями и образцами сыворотки соблюдать существующие правовые нормы.

### СОДЕРЖИМОЕ НАБОРА

Состав	Для 96 определений
Кол-во, шт.: 1	Разделяемый микропланшет, состоящий из 12 модулей по 8 ячеек каждый, покрытых высокоочищенным античеловеческим- $\beta_2$ -микроглобулином IgG (поликлональный). Готов к использованию.
6 флаконов, 1,5 мл каждый	Калибраторы $\beta_2$ -микроглобулина (A-F) в PBS\BSA матриксе (NaN3<0.1% (w/w)), содержащие $\beta_2$ -микроглобулина: 0; 0,75; 1,5; 3; 6; 12 мкг/мл. Готовы к использованию.
2 флакона, 1,5 мл каждый	Контроли $\beta_2$ -микроглобулина в PBS\BSA матриксе (NaN3<0.1% (w/w)) положительный (1) и отрицательный (2); информацию о соответствующих концентрациях искать во вкладыше инструкции. Готовы к использованию.
1 флакон, 20 мл	Буфер образца (Tris, NaN3<0.1% (w/w)), концентрат желтого цвета (5x).
1 флакон, 15 мл	Раствор ферментного конъюгата (PBS, PROCLIN 300<0.5 % (v/v)), (бледно-розовый), содержит поликлональный античеловеческий $\beta_2$ -микроглобулин IgG; помеченный пероксидазой хрена. Готов к использованию.
1 флакон, 15 мл	Раствор субстрата ТМБ, Готов к использованию.
1 флакон, 15 мл	Стоп раствор (содержит кислоту). Готов к использованию.
1 флакон, 20 мл	Промывочный раствор (PBS, NaN3<<0.1% (w/w)), концентрат (50x).

### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

1. Хранить набор при 2-8 °C.

- Хранить ячейки микропланшета запечатанными в сухом пакете с осушителем.
- Реагенты стабильны до окончания срока годности.
- Не поддавать реагенты влиянию жары, солнца или сильного света во время хранения или использования.
- Разбавленный буфер образцов и мощный буфер стабильны до 30 дней при хранении при 2-8 °С.

## ТРЕБУЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

### Оборудование

- Считывающее устройство микропланшета, снимающее показатели конечной точки с длиной волны 450 нм
- Многоканальный дозатор или пипетка для дозирования на 100 мкл
- Вихревая мешалка
- Пипетки на 10, 100 и 1000 мкл
- Лабораторное часовое устройство
- Программное обеспечение по обработке данных

### Подготовка реагентов

- Дистиллированная или деионизированная вода
- Мерный цилиндр на 100 и 1000 мл
- Пластиковый контейнер для хранения промывочного раствора

## ЗАБОР, ХРАНЕНИЕ И ОБРАЩЕНИЕ С ОБРАЗЦОМ

- Провести забор образцов утренней мочи либо цельной крови, используя приемлемую медицинскую технологию, избегая гемолиза.
- Дать крови возможность свернуться и отделить сыворотку центрифугированием.
- Сыворотка должна быть чистой и негемолизированной. Необходимо избегать загрязнения гемолизом или липемией, но не вмешиваться в проведение теста.
- Образцы должны храниться при 2-8 °С до 5 дней или при -20 °С до шести месяцев.
- Избегать повторного замораживания и размораживания образцов сыворотки и мочи. Это может привести к потере активности протеина.
- Не рекомендуется тестирование инактивированной жарой сыворотки.

## ПРОЦЕДУРНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

- Не использовать компоненты набора после окончания срока годности.
- Не менять компоненты набора между разными лотами.
- Все материалы следует привести к комнатной температуре (20-28 °С).
- Все реагенты должны быть готовы перед началом проведения анализа. После начала, анализ необходимо проводить непрерывно для получения надежных и точных результатов.
- Проводить все шаги анализа в указанном порядке.
- Всегда использовать свежеразбавленные образцы.
- Пипетировать все реагенты и образцы на дно ячеек.
- Для предотвращения загрязнения менять наконечники между образцами и разными контролями набора.
- Очень важно промывать ячейки тщательно и удалять полностью всю жидкость для получения оптимальных результатов.
- Все шаги инкубации должны проводиться в определенное время.
- Контрольная сыворотка или фонд должны анализироваться в плановом порядке, как неизвестные, для проверки работы реагентов и анализа.
- Не используйте повторно ячейки микропланшета.

Для всех контролей, на этикетках флаконов указаны соответствующие концентрации. Используя эти концентрации, может быть вычислена калибровочная кривая для полуколичественного считывания результатов пациента.

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

### Приготовление буфера образца

Разбавить содержимое каждого флакона концентрата буфера образца (5x) с дистиллированной водой до конечного объема 100 мл перед использованием. Хранить охлажденным: стабильны при 2-8° С, по крайней мере, 30 дней после приготовления или до окончания срока годности, указанного на этикетке.

### Приготовление промывочного раствора

Разбавить содержимое каждого флакона концентрата промывочного раствора (50x) с дистиллированной или деионизированной водой до конечного объема 1000 мл перед использованием. Хранить охлажденным: стабильны при 2-8° С, по крайней мере, 30 дней после приготовления или до окончания срока годности, указанного на этикетке.

## Приготовление образца

Разбавить все образцы мочи 1:100 буфером для образцов перед исследованием. Для этого смешайте 100 мкл мочи и 900 мкл буфера для образцов в полистироловых пробирках. Смешать хорошо. Образцы плазмы или сыворотки пациентов развести 1:100 буфером для образцов перед анализом. Для этого добавьте 10 мкл образца к 1,000 мкл буфера для образца в пробирке из полистирола. Тщательно перемешайте. Калибраторы и контроли готовы к использованию, их не нужно разбавлять.

## ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

- Подготовить достаточное количество модулей микропланшета для помещения калибраторов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов в дублях.

	1	2	3	4	5	6
A	SA	SE	P1	P5		
B	SA	SE	P1	P5		
C	SB	SF	P2	P..		
D	SB	SF	P2	P..		
E	SC	C1	P3			
F	SC	C1	P3			
G	SD	C2	P4			
H	SD	C2	P4			

SA-SF: стандарты от А до F  
P1,P2..образцы пациентов 1,2  
C1: положительный контроль  
C2: отрицательный контроль

- Пипетировать **100 мкл** калибраторов, контролей и предварительно разбавленных образцов пациентов в ячейки.
- Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре (20-28 °С).
- Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора.
- Добавить **100 мкл** раствора ферментного конъюгата в каждую ячейку.
- Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре.
- Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора.
- Добавить **100 мкл** субстрата ТМВ в каждую ячейку.
- Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре.
- Добавить **100 мкл** стоп раствора в каждую ячейку модулей и выдержать 5 минут.
- Считать оптическую плотность при 450 нм и рассчитать результаты. Бихроматическое измерение проводить при 600-690 нм (рекомендуется).

Развившаяся окраска стабильна в течение 30 минут. Считать оптическую плотность за это время.

## Автоматизация

Набор "ORGENTEC β<sub>2</sub>-микροглоблин ELISA" может быть использован с открытыми автоматическими ELISA процессорами. Тестовая процедура, описанная выше, пригодна для использования с или без автоматизации.

## ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

### Контроль качества

Данный тест является действительным только, если оптическая плотность при 450 нм для Положительного Контроля (1) и Отрицательного Контроля (2), а также для калибраторов А-Ф, соответствует диапазонам, указанным в сертификате контроля качества, поставляемого вместе с набором! Если какие-либо критерии не соответствуют, результаты считаются недействительными, и тест необходимо повторить.

### Вычисление результатов

Для данного набора рекомендуется метод 4-параметрической регрессии с линейно-логарифмическими координатами для оптической плотности и концентрации.

**Результаты образцов сыворотки могут быть считаны прямо со стандартной кривой. Результаты образцов мочи должны быть разделены на 10 после расчетов!**

### Рекомендуемая линейно-логарифмическая диаграмма

Сначала рассчитать средние оптические плотности для каждого калибратора. Использовать линейно-логарифмическую миллиметровку и отложить среднюю оптическую плотность против концентрации для каждого калибратора. Провести оптимальную калибровочную кривую, используя все точки. Калибровочные точки также могут быть соединены в участки прямых линий. Концентрация неизвестных образцов вычисляется интерполяцией.

### Пример вычисления

Указанные ниже значения являются типичными для β<sub>2</sub>-микροглоблин ELISA. Эти данные предназначены только для иллюстрации и не могут быть использованы для вычисления результатов пациентов.

## Calibrators

No	Position	OD 1	OD 2	Mean	Conc. 1	Conc. 2	Mean	decl.Conc.	CV%
ST1	A 1/A 2	0.027	0.024	0.025	0.10	0.10	0.10	0.00	8
ST2	B 1/B 2	0.539	0.524	0.532	0.79	0.77	0.78	0.75	2
ST3	C 1/C 2	0.911	0.910	0.910	1.4	1.4	1.4	1.5	0
ST4	D 1/D 2	1.484	1.527	1.506	3.0	3.2	3.1	3.0	2
ST5	E 1/E 2	1.965	1.903	1.934	6.5	5.8	6.1	6.0	2
ST6	F 1/F 2	2.204	2.210	2.207	11.4	11.6	11.5	12.0	0



## ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»  
ул.Черновола, 97  
г. Ивано-Франковск, 76005  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.com](http://www.diameb.com)

**Интерпретация результатов**

При изучении нормального диапазона использовались образцы мочи и сыворотки/плазмы здоровых пациентов, и был установлен следующий диапазон значений:

Образцы мочи: 0-0.3 мкг/мл

Образцы сыворотки или плазмы: 0-3.0 мкг/мл

Каждой лаборатории рекомендуется установить свой собственный диапазон нормальных и патологических значений для образцов мочи.

**РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ****Параллельность**

В экспериментах по разбавлению проб сыворотки и мочи с высокими концентрациями  $\beta_2$ -микроглобулина были разбавлены буфером для образцов и проанализированы. Анализ показывает линейность на всем диапазоне измерения.

**Точность (Воспроизводимость)**

Статистические данные для коэффициентов вариации (CV) были рассчитаны для каждого из трех образцов в 24 определениях в одном опыте для оценки воспроизводимости внутри серии. Воспроизводимость между сериями оценивалась по результатам 5 различных опытов по 6 определений каждого образца:

Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample No	Mean [ $\mu\text{g/ml}$ ]	CV [%]	Sample No	Mean [ $\mu\text{g/ml}$ ]	CV [%]
1	1.6	4.2	1	1.7	4.9
2	7.2	2.6	2	7.5	3.8
3	12.5	3.6	3	13.1	4.9

**Чувствительность**

Нижний предел обнаружения для  $\beta_2$ -микроглобулина составил 0,1 мкг/мл.

**Специфичность**

Антисыворотка анти- $\beta_2$ -микроглобулина (поликлональная), использованная для покрытия микропланшета, является высокоспецифичной к человеческому  $\beta_2$ -микроглобулину. Перекрестная реактивность не наблюдалась.

**ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ**

Набор "ORGENTEC  $\beta_2$ -микроглоблин ELISA" предназначен для диагностических целей. Установление клинического диагноза не должно основываться на результатах одного теста и должно учитывать все данные клинических и лабораторных исследований.

**ИНТЕРФЕРИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА**

На результаты теста не влияют гемолизованная (до 1000 мг/дл), липемическая (до 3 г/дл триглицеридов) сыворотка или сыворотка, содержащая билирубин (до 40 мг/дл). Не было обнаружено влияния при использовании антикоагулянтов. Тем не менее, в практических целях рекомендуется не использовать сильно гемолизованную или липемическую сыворотку.

**СХЕМА ИНКУБАЦИИ**

- 1 Пипетировать **100 мкл** калибраторов, контролей или образца пациентов
  - Инкубировать **30 минут** при комнатной температуре
  - Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора
- 2 Пипетировать 100 мкл ферментного конъюгата
  - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
  - Удалить содержимое ячеек и трижды промыть с **300 мкл** промывочного раствора
- 3 Пипетировать 100 мкл раствора Субстрата
  - Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре
- 4 Добавить 100 мкл Стоп раствора
  - Выдержать **5 минут**
  - Считать результат при **450 нм**

