

НАБІР РЕАГЕНТІВ

МІКРОГЛОБУЛІН БЕТА-2

β-2 Microglobulin ELISA

Кат. №: EIA-1789

Дата випуску інструкції: 2018/06
Версія 4.0



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

Зберігати при температурі 2-8 °С.

1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Цей набір призначений для кількісного визначення β-2 Мікроглобуліну у сироватці крові людини. Цей аналіз призначений для використання в якості допомоги в діагностиці захворювання нирок.

Для використання в in vitro діагностиці.

2 ВСТУП

Бета-2-мікроглобулін (β2-MG) виражається ядрами клітин організму і на багатьох пухлинних лініях. Людський β2-MG - білок з низькою молекулярною вагою (MW 11600), що складається з одного поліпептидного ланцюга з 99 амінокислот. Він тотожний невеликому ланцюжку антигенів комплексу HLA-A, -B і -C основних комплексів гістосумісності. У структурі та амінокислотній послідовності він нагадує СН3-ділянку IgG, хоча антигенно відрізняється.

β2-MG виводиться через нирки. Після фільтрації через клубочки, він реабсорбується і катаболізується проксимальними трубчастими клітинами через ендцитоз. Він виявляється при низьких рівнях у сироватці та сечі у здорової людини.

Як правило, лише мікроелементи β2-MG виділяються з сечею, а більш високі показники інтерпретуються як доказ трубної дисфункції. Екскреція сечі помітно підвищується при розладах тубулоінтерстиціальних захворювань, а також там, де присутні аміноглікозиди та протизапальні сполуки. β2-MG також виводиться з підвищеним вмістом у сечі пацієнтів з інфекціями верхніх сечовивідних шляхів та захворюваннями сполучної тканини, такими як ревматоїдний артрит та синдром Шьогрена.

Підвищена концентрація в сироватці при наявності нормальної швидкості клубочкової фільтрації свідчить про збільшення виробництва або вивільнення β2-MG. У пацієнтів з ревматоїдним артритом, системним червоним вовчаком, саркоїдозом та деякими вірусними захворюваннями, включаючи цитомегаловірус, гепатит не типу А, не типу В та інфекційний мононуклеоз,^{15,16} рівень сироватки β2-MG змінюється у порівнянні з активністю захворювання.

β2-MG ELISA забезпечує чутливий і надійний аналіз для вимірювання β2-мікроглобуліну в сироватці людини. Набір має стандартний діапазон від 0,625 до 10 мкг/мл і визначає мінімальну виявлену концентрацію 0,1 мкг/мл. Аналіз дає результати менш, ніж за 2 години у форматі мікропластини.

3 ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Тест β2MG ELISA базується на принципі твердофазового ферментно-пов'язаного імуносорбентного аналізу. Система аналізу використовує моноклональне антитіло анти-β2-MG для іммобілізації твердої фази (на мікролунках). Антитіло анти-β2-MG вівці знаходиться в розчині кон'юганту антитіло-фермент (пероксидаза хрому). Розбавлений тестовий зразок спочатку реагує з іммобілізованим антитілом протягом 30 хвилин при 37 °С. Кон'югат анти-β2-MG-HRPO вівці потім додають та відбувається реакція з іммобілізованим антигеном протягом 30 хвилин при 37 °С, в результаті чого молекули β2-MG укладаються між твердою фазою та ферментно-зв'язаними антитілами.

Лунки промивають водою для видалення незв'язаних мічених антитіл. Додають розчин ТМВ та інкубують протягом 20 хвилин при кімнатній температурі, в результаті чого утворюється синій колір. Розвиток кольору зупиняється після додавання 1N HCl, змінюючи колір на жовтий.

Концентрація β2-MG прямо пропорційна інтенсивності кольору досліджуваного зразка. Поглинання вимірюється спектрофотометрично при 450 нм.

4 МАТЕРІАЛИ ТА РЕАГЕНТИ, ЩО ВХОДЯТЬ ДО НАБОРУ

1. **Лунки покриті антитілом** (1 планшет, 96 лунок)
Мікротитрові лунки покриті мишачим моноклональним анти-β-2MG.
2. Реагент **ферментного кон'югату** (22 мл)

3. Містить анти-β2-MG вівці, кон'юговані з пероксидазою хрому.
Набір референтних **Стандартів** (1 мл/флакон)
Містять 0-0.625-1.25, 2.5, 5 і 10 мкг/мл β2-MG в розчиннику для зразків, попередньо розведені 1:101, ліофілізовані.
4. **Розчинник для зразків** (1 пляшка, 100 мл)
2% BSA в буферному розчині, що містить консервант.
5. **Реагент ТМБ** (1 пляшка, 11 мл)
Містить 3, 3', 5, 5' тетраметилбензидин (ТМБ), стабілізований у буферному розчині.
6. **Стоп-розчин** (1N HCl) (1 пляшка, 11 мл)
Містить розведену хлористоводневу кислоту.

5 НЕОБХІДНІ МАТЕРІАЛИ, ЩО НЕ ВХОДЯТЬ ДО НАБОРУ

- Дистильована або деіонізована вода.
- Прецизійні піпетки: 5мл, 10мл, 50мл, 100мл, 200 мкл і 1 мл.
- Одноразові наконечники для піпеток.
- Мікропланшетний зчитувач для лунок зі зчитуванням абсорбції при 450 нм.
- Вортексний міксер або аналог.
- Абсорбуючий папір.
- Графічний папір.
- Додатковий контроль якості матеріалу (від DRG або BioRad).

6 ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

1. УВАГА: Цей набір містить матеріал людського походження. Вихідний матеріал, який використовується для виробництва цього набору, дав негативний результат до HBsAg, ВІЛ 1/2 і ВГС за затвердженими FDA методиками. Однак, жодний метод не може повністю гарантувати відсутність цих агентів. Таким чином, всі продукти крові людини, в тому числі зразки сироватки, слід розглядати як потенційно інфекційні. Обробку та утилізацію слід здійснювати відповідно до національних посібників або правил з безпеки в поводженні з біологічно небезпечними речовинами.²¹
2. Не використовувати реагенти після закінчення терміну придатності і не змішувати або використовувати компоненти з наборів з номерами лотів.
3. Не використовуйте реагент, коли він стає каламутним, або є ознаки забруднення.
4. Не використовуйте реагент, якщо флакон пошкоджений.
5. Закривайте флакони з реагентами відразу після використання. Не міняти ковпачки.
6. Кожну лунку слід використовувати тільки один раз.
7. Не піпетувати реагенти ротом.
8. Розчини, що містять добавки і консерванти, такі як азид натрію, не повинні використовуватися в ферментній реакції.
9. Уникайте контакту з 1N HCl. Це може викликати подразнення шкіри та опіки. Якщо контакт відбувається, промити великою кількістю води і звернутися до лікаря якщо подразнення не проходить.
10. Для використання в діагностиці *in vitro*.

7 УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ

1. Зберігати закритий набір при 2-8 °С після отримання і коли він не використовується, до закінчення терміну, зазначеного на етикетці. Термін придатності зазначений на етикетці.
2. Відкриті та використані реагенти стабільні до закінчення терміну придатності при правильному зберіганні при температурі від 2 °С до 8 °С.
3. Тримати планшет в герметичній упаковці з осушувачем, щоб мінімізувати вплив вологого повітря.

8 ЗБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

Сироватку слід готувати зі зразка цільної крові, отриманої відповідними медичними методами забору крові.

Цей набір призначений для використання зі зразками сироватки без добавок.

Уникайте сильно гемолітичних (яскраво-червоних), ліпемічних (молочних) або мутних зразків.

Зразки повинні бути закриті та можуть зберігатися протягом 48 годин при температурі від 2 °С до 8 °С. Зразки, які зберігаються протягом тривалого часу, повинні бути заморожені лише один раз при -20 °С перед аналізом. Розморожені зразки повинні бути кілька разів перевернуті перед тестуванням.

9 ІНСТРУМЕНТАРІЙ

Зчитувач мікротитрових лунок з шириною смуги 10 нм або менше та діапазоном оптичної щільності від 0-3 ОД або більше при довжині хвилі 450 нм є прийнятним для вимірювання абсорбції.

10 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

1. Перед використанням довести всі реагенти до кімнатної температури (18-25 °С).

- Всі реагенти необхідно перемішати шляхом обережного перевертання перед використанням. Не утворювати піну.
- Відновіть кожен ліофілізований **стандарт** з 1.0 мл дистильованої води.
Дозвольте відновленому матеріалу вистояти принаймні 20 хвилин і обережно перемішати.
Відновлені стандарти слід зберігати герметично закритими при температурі від 2 °C до 8 °C; вони залишаються стабільними щонайменше протягом 30 днів при цій температурі.

11 ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

ПРИМІТКА:

Зразки пацієнтів і контрольовану сироватку потрібно розбавити перед використанням.

Підготуйте серію малих пробірок (наприклад, 1.5 мл мікроцентрифужні пробірки) та змішайте 10 мкл сироватки з 1.0 мл з Розчинником для Зразків (розведення 1:101).

Не розбавляйте стандарти, вони вже попередньо розведені 1:101.

- Закріпіть потрібну кількість лунок у тримачі.
- Внесіть 20 мкл стандартів, розбавлених зразків та розведених контролів у відповідні лунки.
- Внесіть 200 мкл Розчинника для Зразків в кожну лунку.
Ретельно перемішайте протягом 30 секунд. Дуже важливим є повне змішування.
- Інкубуйте при 37 °C протягом 30 хвилин.
- Видаліть інкубаційну суміш в контейнер для сміття.
- Промийте та видаліть вміст мікротитрових лунок 5 разів з деіонізованою або дистильованою водою. НЕ ВИКОРИСТОВУЙТЕ ВОДУ З КРАНУ.
- Швидко переверніть лунки на абсорбуючий папір або паперові рушники, щоб видалити всі залишки крапель води.
- Внесіть 200 мкл Ферментного Кон'югату в кожну лунку. Обережно змішайте протягом 10 секунд.
- Інкубуйте при 37 °C протягом 30 хвилин.
- Видаліть вміст та промийте планшет, як описано вище, в кроках 5-7.
- Внесіть 100 мкл реагенту ТМБ у кожну лунку. Обережно змішайте протягом 10 секунд.
- Інкубуйте при кімнатній температурі, **в темряві**, протягом 20 хвилин.
- Зупиніть реакцію, додавши 100 мкл Стоп-Розчину (1N HCl) в кожну лунку.
- Обережно змішайте протягом 10 секунд. **Важливо переконатися, що весь синій колір повністю змінюється на жовтий колір.**
- Протягом 15 хвилин** зчитуйте абсорбцію при 450 нм за допомогою мікропланшетного рідера.

12 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

- Розрахуйте середні значення поглинання (ОЩ 450 нм) для кожного набору референтних стандартів, контролів та зразків.
- Побудуйте стандартну криву, зображуючи середню абсорбцію, отриману для кожного референтного стандарту до його концентрації в мкг/мл на графічному папері, з абсорбцією по вертикальній осі (y) і концентрацією на горизонтальній осі (x).
- За допомогою середніх значень поглинання для кожного зразка по стандартній криві визначіть відповідну концентрацію β 2-MG в мкг/мл. Залежно від досвіду та/або наявності можливостей комп'ютера, можуть використовуватися інші способи обробки даних.

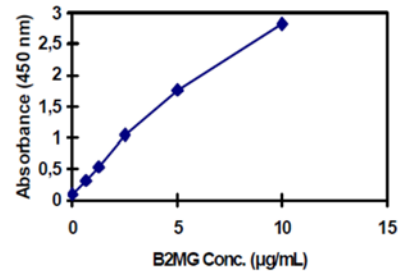
13 Процедурні зауваження

- Ручне піпетування:** рекомендується використовувати не більше 32 лунок для виконання кожної процедури аналізу. Піпетування усіх стандартів, зразків та контролів повинно бути завершено протягом 3 хвилин.
- Автоматизоване піпетування:** в кожній процедурі аналізу може використовуватися 96-лунковий планшет. Однак, рекомендується завершити піпетування всіх стандартів, зразків і контролів протягом 3 хвилин.
- Всі стандарти, зразки і контролі повинні використовуватися одночасно в двох примірниках, дотримуючись всюди однакових умов дослідження.
- Рекомендується проводити зчитування лунок протягом 15 хвилин після додавання Стоп-Розчину.

14 ПРИКЛАД СТАНДАРТНОЇ КРИВОЇ

Результати типового стандартного пробігу з результатами поглинання при 450 нм представлені на осі Y проти концентрацій β 2-MG, показаних на осі X. Ця стандартна крива призначена лише для ілюстрації і не повинна використовуватися для розрахунку невідомих. Кожен користувач повинен отримати свою власну стандартну криву та дані пацієнта в кожному експерименті.

β 2-MG (мкг/мл)	Поглинання (450 нм)
0.0	0.095
0.625	0.317
1.25	0.534
2.5	1.043
5.0	1.763
10.0	2.821



15 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Рекомендується, щоб кожна лабораторія встановила власний нормальний діапазон.

Проте здорові особи повинні мати значення β 2-MG в сироватці від 0 до 2.0 мкг/мл.

Діапазон концентрації β 2-мікроглобуліну у сироватці крові визначали за допомогою ELISA β 2-мікроглобуліну (EIA-1789) на зразку населення 66 здорових дорослих. Виявлено наступне:

Середнє значення = 1.42 мкг/мл

CV = 0.508 мкг/мл

Середнє \pm 2 CV 0.4 – 2.8 мкг/мл

16 РОБОЧІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

16.1 Точність

Статистичне дослідження, в якому було використано 124 зразки здорових та нездорових пацієнтів, в межах концентрації β 2-MG від 0,4 мкг/мл до 17,2 мкг/мл, продемонструвало хорошу кореляцію з комерційно доступним набором, як показано нижче. Порівняння β 2-MG ELISA (EIA-1789) та набору Immulite® 2000 β 2-MG дало такі дані:

K-сть = 124

Коефіцієнт кореляції = 0,9534

Схил = 0,9342 (дисперсія = 0,0007, SE = 0,0268).

Перехоплення = 0,0498 (дисперсія = 0,0095, SE = 0,0974)

EIA-1789 Середнє значення = 2,72 мкг/мл

Immulite Середнє значення = 2.85 мкг/мл

Аналогічно додаткове дослідження з використанням другого комерційного набору було проведено на 30 відомих зразках пацієнтів з підвищеним рівнем β 2-MG (від 3,2 мкг/мл до 65,8 мкг/мл). Дослідження продемонструвало високу кореляцію; дані наведено нижче.

K-сть = 30

Коефіцієнт кореляції = 0,9932

Схил = 1,0097 (дисперсія = 0,0005, SE = 0,0223)

Перехоплення = 0,4941 (дисперсія = 0,1548, SE = 0,3934)

EIA-1789 Середнє значення = 12,86 мкг/мл

Dade Behring = 12.25 мкг/мл

16.2 Чутливість

Мінімальна виявлена концентрація β 2-MG аналізу ELISA, виміряна 2 CV з середнього значення нульового стандарту, оцінюється щонайменше як 0.1мкг/мл.

16.3 Точність

16.3.1 Точність в аналізі

Точність в аналізі визначалася повторними визначеннями трьох різних зразків сироватки в одному дослідженні. В межах аналізу варіація показана нижче:

Зразок сироватки	1	2	3
K-сть повторів	20	20	20
Середнє β 2-MG (мкл/мл)	0.92	1.63	4.43
Стандартне відхилення	0.100	0.108	0.228
Коефіцієнт варіації (%)	10.8	6.6	5.2

16.3.2 Точність між аналізами

Точність вимірювання між аналізами визначалася повторними вимірами трьох різних зразків сироватки через серію індивідуально відкаліброваних аналізів.

Зразок сироватки	1	2	3
К-сть повторів	24	24	24
Середнє β 2- MG (мкг/мл)	0.83	2.03	4.90
Стандартне відхилення	0.065	0.097	0.350
Коефіцієнт варіації (%)	7.8	4.8	7.2

16.4 Дослідження Відновлення та Лінійності

16.4.1 Відновлення

Різні зразки сироватки з відомими рівнями β 2-MG об'єднували і аналізували в двох примірниках. Середнє значення відновлення становило 98.0%.

Очік. Конц. (мкг/мл)	Отрим. конц.(мкг/мл)	Відновлення %
9.9	10.0	101
8.2	8.9	109
7.4	6.5	88
5.3	5.3	98
3.5	3.8	109
1.5	1.4	94
0.63	0.67	106
Середнє: 100.7%		

16.4.2 Лінійність

Три зразки були серійно розбавлені для визначення лінійності. Середнє значення лінійності становило 95.7%.

#	Розведення	Очік. конц. (мкг/мл)	Отрим. Конц. (мкг/мл)	% Очікуване
1.	Нерозведений	---	10.33	---
	1:2	5.17	5.08	102
	1:4	2.58	2.65	103
	1:8	1.29	1.33	103
	1:16	0.64	0.63	98
Середнє = 102%				
2.	Нерозведений	---	6.95	---
	1:2	3.48	3.27	94
	1:4	1.74	1.64	96
	1:8	0.87	0.79	91
	1:16	0.43	0.42	98
Середнє = 95%				
3.	Нерозведений	---	7.16	---
	1:2	3.58	3.23	90
	1:4	1.79	1.69	94
	1:8	0.90	0.74	82
	1:16	0.45	0.42	93
Середнє = 90%				

16.5 Специфічність

Наступні гормони були перевірені на перехресну реактивність:

Тестований гормон	Концентрація	Вироблена інтенсивність кольору еквівалентна до β 2-у сироватці(мкг/мл)
Альфа-Фетопротейн (AFP)	1,000 нг/мл	0.0
	5,000 нг/мл	0.0
	10,000 нг/мл	0.0
Карциноембріональний антиген (CEA)	1,000 нг/мл	0.0
	5,000 нг/мл	0.0
	10,000 нг/мл	0.0
Феритин	1,000 нг/мл	0.0
	5,000 нг/мл	0.0
	10,000 нг/мл	0.0
Простатичний специфічний антиген (ПСА)	1,000 нг/мл	0.0
	5,000 нг/мл	0.0
	10,000 нг/мл	0.0
Людський IgG	5 г/л	0.0
	10 г/л	0.0
	25 г/л	0.0

16.6 Хук-ефект

У цьому дослідженні на рівні β 2-MG до 250 мкг/мл не спостерігається жодного хук-ефекту.

17 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Належна лабораторна практика вимагає, щоб контрольні зразки (контролі) запускали з кожною калібрувальною кривою для перевірки ефективності аналізу. Контролі, що містять азид натрію, не можуть бути використані. Для забезпечення належної роботи контрольний матеріал слід використовувати постійно, щоб встановити середні значення та прийнятні діапазони.

18 ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

1. Надійні і відтворювані результати будуть отримані, коли процедура аналізу проводиться з повним розумінням інструкції набору і з дотриманням належної лабораторної практики.
2. Тільки для професійного використання. Результати, отримані від використання цього набору, повинні застосовуватися тільки як доповнення до інших діагностичних процедур і інформації, яка доступна лікарю.
3. З цим тестом не слід застосовувати зразки сироватки, що демонструють ліпемію, гемоліз чи мутність.
4. Процедура промивання дуже важлива. Недостатнє промивання призводить до низької точності та помилково завищених показників абсорбції.



ВИРОБНИК

DRG Інструментс ГмбХ
вул. Фраунберг 18, 35039
м. Марбург, Німеччина
Тел: +49(0)64 21/170 00
Факс: +49(0)64 21/17 00 50
www.drq-diagnostics.de
e-mail: drq@drq-diagnostics.de



УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»
вул. Симона Петлюри, 25
м. Івано-Франківськ, 76014
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.ua

