

НАБОР ИФА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЕТА-2 МИКРОГЛОБУЛИНА

EIA-1789, Beta-2 Microglobulin ELISA

Каталог. № : EIA-1789
Количество : 96
Производитель: DRG, (США)

Методика от 02-12-2013
Версия 3.0



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

НАЗНАЧЕНИЕ

Настоящий набор предназначен для количественного определения концентрации β 2-микроглобулина в человеческой сыворотке.

ВВЕДЕНИЕ

Человеческий β 2-микроглобулин (B2MG) является 11,8 кДа протеин, идентичный легкой цепи HLA-A, -B, -C антигена. B2MG выражается в ядерных клетках и обнаружен при низких уровнях в сыворотке и моче нормальных индивидов. Концентрация B2MG увеличивается при воспалительных заболеваниях, некоторых вирусных заболеваниях, нарушении работы почек и аутоиммунных заболеваниях. Численные публикации описывают интерпретацию уровней B2MG в сыворотке при оценке статуса индивидов при разных клинических условиях.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Набор DRG B2MG ELISA базируется на принципе твердофазового ферментно-связанного иммуносорбентного теста. Система набора использует моноклональное антитело, направленное против дистинктивной антигенной детерминанты на интактной B2MG молекуле. Мышиное моноклональное анти- B2MG антитело используется для иммобилизации твердой фазы (на ячееках). Овечье анти- B2MG антитело присутствует в антитело-энзим (пероксидаза хрена) растворе конъюгата. Разбавленный тестовый образец реагирует сначала с иммобилизованным антителом 30 минут при 37°C. Овечий анти-B2MG-HRPO конъюгат потом добавляется и реагирует с иммобилизованным антигеном 30 минут при 37°C, в результате чего молекулы B2MG будут захватываться между твердой фазой и энзим-связанными антителами. Ячейки промываются для удаления несвязанных меченных антител. Раствор TMB реагента добавляется и инкубируется 20 минут при комнатной температуре, в результате развивается голубой окрас. Развитие окраса останавливается добавлением стоп раствора, что изменяет цвет на желтый. Концентрация B2MG прямо пропорциональна интенсивности окраса тестового образца. Абсорбция измеряется спектрофотометрически при 450 нм.

РЕАГЕНТЫ

Поставляемые материалы:

1. Планшет на 96 лунок, покрытых мышиным моноклональным анти- B2MG антителом
2. Ферментный конъюгат, 22 мл
3. Стандарты 1мл/флакон, содержащие 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5 и 10 мкг/мл β 2-MG 1 набор, предварительно 101кратно разбавленные;
4. Разбавитель образцов, 100 мл
5. TMB реагент (одна бутылка), 11 мл
6. Стоп раствор (1N HCl), 11 мл

Необходимые, но не поставляемые материалы.

1. Дистиллированная или деионизированная вода.
2. Пипетки на 5, 10, 50, 100, 200 мкл и 1.0 мл
3. Сменные наконечники к пипеткам
4. Микропланшетный ридер
5. Вортекс или аналогичный смеситель
6. Абсорбирующая бумага
7. Графическая бумага
8. Материалы контроля качества

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. ВНИМАНИЕ: этот набор содержит человеческий материал. Исходный материал, используемый для производства этого набора, дал отрицательный результат на HBsAg, ВИЧ 1/2 и ВГС

по FDA утвержденным методам. Тем не менее, ни один метод не может полностью гарантировать отсутствие этих агентов. Поэтому все продукты крови, в том числе образцы сыворотки, должны рассматриваться как потенциально инфицированные. Обработка и утилизация должны проводиться, как это определено соответствующими национальными нормами по биологической безопасности.

2. Не используйте реагенты после истечения срока годности и не смешивайте компоненты из наборов с другими серийными номерами.
3. Не используйте реагент, когда она становится мутным, или подозревается загрязнение.
4. Не следует использовать реагент, если флакон поврежден.
5. Закройте флаконы с реагентами крышками немедленно после использования. Не менять колпачки.
6. Каждую лунку использовать только один раз.
7. Не пипетировать реагенты ртом.
8. Растворы, содержащие добавки или консерванты, такие как азид натрия, не следует использовать в ферментативной реакции.
9. Избегать контакта с 1N HCl. Это может вызвать раздражение кожи и ожоги. Если произошел контакт, промойте большим количеством воды и обратитесь к врачу, если раздражение не проходит.
10. Для диагностики в лабораторных условиях.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ

1. Хранить невскрытый набор при 2-8 °C при получении и когда он не используется, до истечения указанного на этикетке набора срока годности.
2. Вскрытые и используемые реагенты стабильны до окончания срока годности при хранении при температуре 2-8 °C.
3. Держите планшет в запечатанном пакете с осушителем для минимизации воздействия влажного воздуха.

СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

1. Сыворотку получают из проб цельной крови, взятых подходящим способом. Этот набор предназначен только для работы с образцами без добавок. Избегайте сильно гемолитических (ярко-красный), липемических (молочных) или мутных образцов.
2. Образцы должны быть закрытыми и могут храниться до 48 часов при температуре 2-8 °C. Образцы, предназначенные для более длительного времени, следует заморозить при -20 °C до анализа. Размороженные образцы должны быть несколько раз перевернуты перед тестированием.

ПРИБОРЫ

Микротитровальный ридер с шириной полосы 10 нм или меньше и оптической плотностью в диапазоне от 0 до 3 OD или больше при длине волны 450 нм является приемлемым для измерения абсорбции.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ

1. Перед использованием все реагенты должны быть приведены к комнатной температуре (18-25°C).
2. Все реагенты нужно аккуратно смешать перед использованием. Не допускайте пенообразования.
3. Разбавьте лиофилизированные стандарты 1.0 мл дистиллированной воды. Оставьте их на 20 минут и мягко смешайте. Разбавленные стандарты останутся стабильными 30 дней при 2-8°C.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

ПРИМЕЧАНИЕ: Образцы пациентов и контрольной сыворотки необходимо развести перед использованием для получения лучших результатов. Приготовьте серии маленьких пробирок (1.5 мл микроцентрифужных пробирок) и смешайте 10 мкл сыворотки и 1.0 мл разбавителя образца (101-кратное разбавление). Не разбавляйте стандарты, они уже разбавлены 101кратно.

1. Поместите необходимое количество стрипов в держатель.
2. Пипеткой внесите 20 мкл стандартов, разбавленных образцов и разбавленных контролей в соответствующие лунки планшета.
3. Добавьте 200 мкл разбавителя образца в каждую лунку. Тщательно перемешайте на протяжении 30 сек. Очень важно достичь полного смешивания на данном этапе.
4. Инкубируйте течение 30 минут при 37°C.
5. Вытряхните содержимое лунок.
6. Промойте дистиллированной или деионизированной водой 5 раз (НЕ ИСПОЛЬЗУЙТЕ ВОДУ ИЗ-ПОД КРАНА).
7. Резко встряхните планшет над фильтровальной бумагой и промокните остатки влаги.

8. Добавьте **200 мкл** ферментного конъюгата в каждую лунку. Легко смешивайте **10 секунд**.
9. Инкубируйте **30 минут** при 37°C.
10. Удалите инкубационную смесь и промойте, как описано в шагах 5-7.
11. Добавьте **100 мкл** TMB реагента в каждую лунку. Легко смешивайте 10 секунд.
12. Инкубируйте течение **20 минут** при комнатной температуре в темноте.
13. Добавьте **100 мкл** стоп реагента в каждую лунку.
14. Легко смешивайте **10 секунд**. **Очень важно, чтобы весь голубой цвет стал желтым**.
15. Измерьте оптическую плотность ячеек при **450 нм** микротитровальным луночным считывателем **в течении 15 минут**.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

1. Вычислите среднее значение абсорбции (A_{450}) для каждого набора стандартов, контролей и образцов.
2. Постройте стандартную кривую, отмечая среднее значение абсорбции, полученное из каждого стандарта напротив его концентрации в мкг/мл на графической бумаге, отметьте точки значений абсорбции на вертикальную ось Y, а соответствующие концентрации на горизонтальную ось X.
3. Используйте среднее значение абсорбции для каждого образца, чтобы определить соответствующее значение концентрации B2MG в мкг/мл со стандартной кривой.

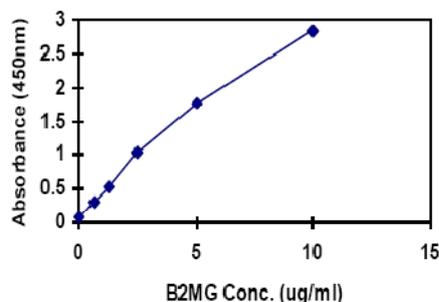
ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ

1. Ручное Пипетирование: Рекомендуется использовать не более 32 лунок для анализа каждой группы образцов. Пипетирование всех стандартов, образцов и контролей должно быть завершено в течение 3 минут.
2. Автоматическое пипетирование: Весь планшет из 96 лунок может быть использован в анализе каждой группы образцов. Тем не менее, рекомендуется, чтобы пипетирование всех стандартов, образцов и контролей было завершено в течение 3 минут.
3. Все стандарты, образцы и контроли следует тестировать в дубликаты, чтобы все условия тестирования были одинаковыми.
4. Рекомендуется, чтобы результаты лунок были считаны в течение 15 минут после добавления стоп-раствора.

Пример типичной калибровочной кривой

Результаты типичного стандартного анализа с абсорбцией при 450 нм показаны на оси Y против концентраций B2-MG, показанных на оси X. Эта стандартная кривая предназначена только для иллюстрации, и не должна использоваться для вычисления неизвестных. Каждый пользователь должен получить свою собственную стандартную кривую и данные пациента в каждом эксперименте.

B2-MG ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbance (450 nm)
0	0.095
0.625	0.317
1.25	0.534
2.5	1.043
5.0	1.763
10.0	2.821



ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Рекомендуется, чтобы каждая лаборатория устанавливала свой собственный диапазон нормы. Тем не менее, здоровые люди должны иметь значения B2-MG в сыворотке в диапазоне от 0 – 2.0 мкг/мл.

Диапазон концентрации B2 микроглобулина в сыворотке определяли с набором ИФА DRG B2-Микроглобулин с 66 образцами здоровых взрослых людей. Результат представлен ниже:

Среднее = 1.42 мкг/мл
 CD = 0.508 мкг/мл
 Среднее \pm 2SD = 0.4 – 2.8 мкг/мл

ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Точность

Статистическое изучение с использованием 124 образцов здоровых и не здоровых пациентов с концентрациями B2-MG от 0.4 мкг/мл до 17.2 мкг/мл, продемонстрировало хорошую корреляцию с коммерчески доступным набором, как показано ниже. Сравнение между DRG B2-MG ИФА и набором DPC Immulite 2000 B2-MG показало следующие результаты:

N = 124
 Коэффициент корреляции = 0.9534
 Наклон = 0.9342 (дисперсия = 0.0007, SE = 0.0268)
 Пересечение = 0.0498 (дисперсия = 0.0095, SE = 0.0974)
 DRG Среднее = 2.72 мкг/мл
 DPC Среднее = 2.85 мкг/мл

Точно так же, дополнительное исследование с помощью второго коммерческого набора проводилось на 30 известных образцах пациентов, с исследованиями, показавшими высокую корреляцию, а полная информация представлена ниже.

N = 30
 Коэффициент корреляции = 0.9932
 Наклон = 1.0097 (дисперсия = 0.0005, SE = 0.0223)
 Пересечение = 0.4941 (дисперсия = 0.1548, SE = 0.3934)
 DRG Среднее = 12.86 мкг/мл
 Dade Behring = 12.25 мкг/мл

2. Чувствительность

Минимально определяемая концентрация анализа DRG B2-MG ELISA, измеренная как 2SD от среднего нулевого стандарта, по оценкам составила 0.1 мкг/мл.

3. Точность

a. Точность внутри анализа

Точность в анализе определялась повторными определениями трех разных образцов сыворотки в одном анализе. Результаты приведены ниже:

Образец	1	2	3
Количество повторов	20	20	20
Среднее значение B2-MG (мкг/мл)	0.92	1.63	4.43
Стандартное отклонение	0.100	0.108	0.228
Коэффициент вариации, %	10.8	6.6	5.2

b. Точность между анализами

Точность в анализе определялась повторными определениями трех разных образцов сыворотки в разных анализах. Результаты приведены ниже:

Образец	1	2	3
Количество повторов	24	24	24
Среднее значение B2-MG (мкг/мл)	0.83	2.03	4.90
Стандартное отклонение	0.065	0.097	0.350
Коэффициент вариации, %	7.8	4.8	7.2

4. Восстановление и линейность

a. Восстановление

Различные образцы сыворотки с известными уровнями B2-MG объединяли и анализировали в двух экземплярах. Среднее восстановление было 98,0%.

Ожидаемая концентрация, мкг/мл	Полученная концентрация, мкг/мл	Восстановление, %
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
		Среднее: 100.7 %

b. Линейность

Три образца пациентов серийно разводили для определения линейности. Средняя линейность составила 95.7 %.

№	Разведение	Ожидаемая концентрация, мкг/мл	Полученная концентрация, мкг/мл	% от Ожидаемой концентрации
1	Неразведенный	----	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
	Среднее = 102 %			
2	Неразведенный	----	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
	Среднее = 95 %			
3	Неразведенный	----	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
	Среднее = 90 %			

5. Специфичность

Следующие гормоны были проверены на перекрестную реактивность:

HORMONE TESTED	CONCENTRATION	PRODUCED COLOR INTENSITY EQUI. TO β 2-MG IN SERUM (μ g/ml)
<i>Alpha-Fetoprotein (AFP)</i>	1,000 ng/ml	0.0
	5,000 ng/ml	0.0
	10,000 ng/ml	0.0
<i>Carcinoembryonic Antigen (CEA)</i>	1,000 ng/ml	0.0
	5,000 ng/ml	0.0
	10,000 ng/ml	0.0
<i>Ferritin</i>	1,000 ng/ml	0.0
	5,000 ng/ml	0.0
	10,000 ng/ml	0.0
<i>Prostate Specific Antigen (PSA)</i>	1,000 ng/ml	0.0
	5,000 ng/ml	0.0
	10,000 ng/ml	0.0
<i>Human IgG</i>	5 g/l	0.0
	10 g/l	0.0
	25 g/l	0.0

6. Хук эффект

Эффект высокой дозы не наблюдается в этом анализе с уровнями β 2-MG до 250 мкг/мл.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Лабораторная практика требует, чтобы образцы контроля качества (контроль) использоваться в каждой калибровочной кривой для проверки характеристик анализа. Контроли, содержащие азид натрия, не могут быть использованы. Для обеспечения надлежащей работы контрольный материал следует анализировать несколько раз, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны.

ОГРАНИЧЕНИЯ ПРОЦЕДУРЫ

1. Надежные и соответствующие результаты будут получены, когда процедура анализа осуществляется с полным пониманием инструкции и с соблюдением надлежащей лабораторной практики.
2. Результаты, полученные в результате использования данного набора, должны использоваться только в качестве дополнения к другим диагностическим процедурам и информации, имеющихся в распоряжении врача.
3. Образцы сыворотки, демонстрирующие липемию, гемолиз или мутность, не должны использоваться с этим тестом.
4. Процедура промывки является критической. Недостаточная промывка приводит к низкой точности и завышенным значениям абсорбции.



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
www.diameb.com