

## VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

Se espera que las personas sanas tengan valores de B2MG en suero o plasma de 0 a 2.0 µg/ml y valores de orina de 0 a 0.3µg/ml. Se estima que la sensibilidad mínima detectable es de 0.1µg/ml.

## REFERENCIAS

1. Berggard I and Beam AG. 1968. Isolation and properties of a low molecular weight  $\beta$ -2 globulin occurring in human biological fluids. J Biol Chem 243: 4095-4103.
2. Grey HM, Kubo RT, Colon SM, Poulik MD, Cresswell P, Springer T, Turner M and Stronminger JL. 1973. The small subunit of HL-A antigens is  $\beta$ 2-microglobulin. J Exp Med 138: 1608-1612.
3. Nakamuro K, Tanigaki N and Pressman D., 1973. Multiple common properties of human B2-microglobulin and the common portion fragment derived from HL-A antigen molecules. Proc Natl Acad Sci 70: 2863-2865.
4. Evrin PE and Wibell L., 1972. The serum levels and urinary excretion of  $\beta$ 2-microglobulin in apparently healthy subjects. Scand J Clin Lab Invest 29:69-74.
5. Crisp AJ, Coughlan RJ, Mackintosh D, Clark B, and Panayi GS. 1983.  $\beta$ 2-microglobulin plasma levels reflect disease activity in rheumatoid arthritis. J Rheumatol 10: 954-956.



ALTA CALIDAD EN PRUEBAS PARA SU LABORATORIO

# Beta-2 Microglobulina ELISA

No. de Producto BM010T (96 Pruebas)

## USO INDICADO

El kit ELISA de Beta-2 Microglobulina está destinado a la determinación cuantitativa de la concentración de beta-2 microglobulina (B2MG) en suero humano.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La  $\beta$ -2 Microglobulina humana (B2MG) es una proteína de 11.8kD idéntica a la cadena ligera del antígeno HLA-A, -B y -C. B2MG se expresa en células nucleadas, y se encuentra en niveles bajos en el suero y la orina de individuos normales. Las concentraciones de B2MG aumentan en enfermedades inflamatorias, algunas enfermedades virales, disfunción renal y enfermedades autoinmunes. Hay varias publicaciones disponibles que explican la interpretación de los niveles séricos de B2MG en la evaluación del estado de las personas con diversas condiciones clínicas.

## PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba ELISA de B2MG se basa en el principio de un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de fase sólida. El sistema de ensayo utiliza un anticuerpo monoclonal único dirigido contra un determinante antigénico distinto en la molécula intacta  $\beta$ -2 Microglobulina. El anticuerpo anti-B2MG monoclonal de ratón se utiliza para la inmovilización de fase sólida (en los pozos de microtitulación). Un anticuerpo anti-B2MG de oveja se encuentra en la solución conjugada de anticuerpos-enzima (peroxidasa de rábano). Se permite que la muestra de ensayo diluida reaccione primero con el anticuerpo inmovilizado durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se añade el conjugado anti-B2MG-HRP de oveja y reacciona con el antígeno inmovilizado durante 30 minutos a 37°C, lo que da como resultado que las moléculas B2MG se empareden entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a enzimas. Los pozos se lavan con agua para eliminar los anticuerpos sin ligaduras. Se añade una solución de reactivo TMB y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente, lo que resulta en el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color se detiene con la adición de la solución de stop, cambiando el color a amarillo. La concentración de B2MG es directamente proporcional a la intensidad del color de la muestra de ensayo. La absorbancia se mide espectrofotométricamente a 450 nm.

MATERIALES PROPORCIONADOS	96 Pruebas
1. Micropocillos recubiertos de anticuerpos anti-B2 MG monoclonales murinos	12x8x1
2. Estándares de referencia B2MG: 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10	1 ml
3. Diluyente de muestra, 100 ml.	100 ml
4. Reactivo conjugado enzimático, 22 ml	22 ml
5. Reactivo TMB (Un paso), 11 ml	11 ml
6. Solución Stop (1N HCl), 11 ml.	11 ml
7. Concentrado de lavado 20X: 1 frasco	25 ml

## MATERIALES NO SUMINISTRADOS

1. Agua destilada o desionizada
2. Pipetas de precisión
3. Puntas de pipeta desechables
4. Lector ELISA capaz de leer la absorbancia a 450 nm
5. Papel de absorción o toalla de papel
6. Papel gráfico

## ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Conservar el kit a 2-8°C
2. Mantenga los micropocillos sellados en una bolsa seca con desecantes.
3. Los reactivos son estables hasta la expiración del kit.
4. No exponga los reactivos de prueba al calor, al sol o a la luz fuerte.

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Posibles materiales biológicos peligrosos:  
El estándar contiene componentes de origen humano, que han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, así como anticuerpos contra el VIH con reactivos autorizados por la FDA. Sin embargo, no existe un método de prueba que pueda ofrecer una garantía completa de que el VIH, el virus de la hepatitis B u otros agentes infecciosos están ausentes. Estos reactivos deben tratarse en el nivel 2 de Bioseguridad, como se recomienda en el manual de los Centros para el Control y la Salud de enfermedades, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. Los resultados óptimos se obtendrán mediante una estricta adhesión al protocolo de prueba. Es esencial pipetear con precisión, así como seguir los requisitos exactos de tiempo y temperatura.
3. No pipetee por vía oral. No fume, coma ni beba en las áreas en las que se manipulan especímenes o reactivos del kit.
4. Los componentes de este kit están diseñados para su uso como unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no deben mezclarse.
5. Los sueros de control y el diluyente de la muestra se conservan con azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con tuberías de plomo y cobre para formar azida metálica explosiva. Para su desecho, enjuague con un gran volumen de agua.

## MANEJO Y RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Se debe extraer sangre utilizando técnicas de venopunción estándar y el suero debe separarse de los glóbulos rojos tan pronto como sea posible. Evite muestras altamente hemolíticas, lipídicas o turbias.
2. Las muestras deben estar tapadas y pueden almacenarse hasta 48 horas a 2-8°C antes del ensayo. Las muestras retenidas durante más tiempo se pueden congelar a -20°C hasta 6 meses antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces para mezclarlas antes de la prueba.
3. Recoger muestras de orina y almacenar a 2-8°C durante un máximo de 5 días o a -20°C durante períodos más largos. Las muestras de orina se diluyen 1:10 añadiendo 50µl de orina a 450µl diluyente de muestra. Utilice el mismo procedimiento de ensayo que para la prueba sérica.

## PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Preparar 1X búfer de lavado añadiendo el contenido de la botella (25 ml, 20X) a 475 ml de agua destilada o desionizada. Conservar a temperatura ambiente (20-25°C).

## PREPERACIÓN PARA EL ENSAYO

1. Todos los reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (20-25°C) antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse invirtiendo suavemente o arremolinando antes de su uso. No induzca espuma.
2. Reconstituir cada estándar liofilizado con 1.0ml de agua destilada. Dejar reposar el material reconstituido durante al menos 20 minutos y mezcle suavemente. Los estándares reconstituidos serán estables durante un máximo de 30 días cuando se almacenen sellados a 2-8°C

## PROCEDIMIENTO DE ENSAYO PARA SUERO Y PLASMA

1. Las muestras de suero del paciente, plasma y suero de control deben diluirse antes de su uso para obtener mejores resultados. Preparar una serie de tubos pequeños (como tubos de microcentrífuga de 1.5ml) y mezclar 10µl de suero con 1.0 ml de diluyente de muestra (dilución de 1/101). No diluir los estándares, ya se han diluido 101 veces.
2. Asegurar el número deseado de pozos recubiertos en el soporte.
3. Distribuir 20µl de estándares, muestras y controles diluidos en los pozos apropiados.
4. Distribuir 200µl de Diluyente de Muestra en cada pozo.
5. Mezclar meticulosamente durante 30 segundos. Es muy importante mezclarlos por completo.
6. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
7. Retirar la mezcla de incubación moviendo el contenido de la placa en un recipiente de desecho.
8. Retirar el líquido de todos los pozos. Lavar los pozos tres veces con 300µL de 1X búfer de lavado. Secar con papel de absorción o toalla de papel.
9. Golpear los pozos fuertemente sobre papel absorbente o toallas de papel para eliminar todas las gotas de líquido residual.
10. Dispensar 200µl de Reactivo Conjugado Enzimático en cada pozo. Mezclar suavemente durante 10 segundos.
11. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
12. Retirar el contenido y lave la placa como se describe en los pasos 7, 8 y 9.
13. Dispensar 100µl de reactivo TMB en cada pozo.
14. Mezclar suavemente durante 10 segundos.

15. Incubar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 minutos.
16. Detener la reacción añadiendo 100µl de solución de Stop a cada pozo.
17. Mezclar suavemente durante 10 segundos. Es importante asegurarse de que todo el color azul cambie a color amarillo por completo.
18. Leer la absorbancia a 450 nm con un lector de pozos de microtitulación en 15 minutos

## CÁLCULO DE RESULTADOS PARA SUERO Y PLASMA

1. Calcular el valor medio de absorbancia ( $A_{450}$ ) para cada conjunto de estándares de referencia, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar trazando la absorbancia media obtenida de cada estándar de referencia frente a su concentración en µg/ml en papel gráfico, con valores de absorbancia en el eje vertical o Y, y concentraciones en el eje horizontal o X.
3. Utilizar los valores medios de absorbancia para cada muestra para determinar la concentración correspondiente de B2MG en µg/ml de la curva estándar.

## PROCEDIMIENTO DE ENSAYO PARA LA PRUEBA DE ORINA

1. Las muestras de orina necesitan una dilución de 1/10 con el diluyente de muestra (es decir, 50µl de orina + 450µl de diluyente de muestra).
2. Seguir el mismo procedimiento de ensayo para la prueba de suero/plasma del paso 2 al paso 18.

## CÁLCULO DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE ORINA

1. Calcular el valor medio de absorbancia ( $A_{450}$ ) para cada estándar de referencia, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar trazando la absorbancia media obtenida de cada estándar de referencia contra su concentración en µg/ml en papel gráfico, con valores de absorbancia en el eje vertical o Y y concentraciones en el eje horizontal o X.
3. Utilizar los valores medios de absorbancia para cada muestra para determinar la concentración correspondiente de β2MG en µg/ml. Dividir los valores calculados en 10.1 (Dado que los estándares de microglobulina β-2 se han diluido 101 veces, los resultados obtenidos de muestras de orina deben dividirse de nuevo en 10.1). Por ejemplo, si el valor calculado para una muestra de orina de la curva estándar es de 2.40µg/ml; entonces el valor real será de  $2.40\mu\text{g/ml} \div 10.1 = 0.238 \mu\text{g/ml}$ .

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Se obtendrán resultados fiables y reproducibles cuando el procedimiento de ensayo se lleve a cabo con una comprensión completa de las instrucciones del inserto del producto y con la adhesión a las buenas prácticas de laboratorio.
2. El procedimiento de lavado es crítico. El lavado insuficiente dará lugar a una precisión deficiente y lecturas de absorbancia falsamente elevadas.
3. Con esta prueba no se deben utilizar muestras séricas que demuestren lipemia, hemólisis grave o turbidez.
4. Los resultados obtenidos del uso de este kit deben utilizarse únicamente como complemento de otros procedimientos de diagnóstico e información disponible para el médico.

## Ejemplo de una curva estándar

Los resultados de una ejecución estándar típica con lecturas de absorbancia a 450 nm se muestran en el eje Y contra las concentraciones de B2MG mostradas en el eje X. Esta curva estándar es sólo para fines ilustrativos y no debe utilizarse para calcular incógnitas. Cada usuario debe obtener sus propios datos y curva estándar.

B2MG (µg/ml)	Absorbancia (450 nm)
0	0.052
0.625	0.377
1.25	0.745
2.5	1.414
5.0	2.085
10.0	2.942