

# **AESKULISA<sup>®</sup>**

THE DIAGNOSTIC TOOL THAT WORKS

# INSTRUCTION MANUAL

**AESKULISA beta-2-Microglobulin**

Ref 3801







Product Ref.	3801
Product Desc.	beta-2-Microglobulin
Manual Rev. No.	003 : 2015-12-18

## Manual de Instruções

### Conteúdo

---

1	Utilização .....	1
2	Aplicações clínicas e princípio do ensaio .....	1
3	Componentes do Kit .....	2
4	Armazenamento e validade .....	2
5	Avisos e medidas de precaução .....	3
6	Recolha da amostra, manipulação e armazenamento .....	4
7	Procedimento do teste .....	4
8	Interpretação quantitativa.....	7
9	Dados Técnicos .....	8
10	Dados do teste / Características do teste.....	8
11	Bibliografia .....	9



## 1 Utilização

**AESKULISA beta-2-Microglobulin** é um teste imunoenzimático em fase sólida com anticorpos anti-beta-2-microglobulina humana altamente purificados para a determinação quantitativa de beta-2-microglobulina em soro humano e plasma.

A determinação de beta-2-microglobulina em soro ou plasma serve para avaliação clínica da activação do sistema imune celular e como marcador tumoral. Beta-2-microglobulina na urina é indicativo de transtornos na função renal.

## 2 Aplicações clínicas e princípio do ensaio

A beta-2-microglobulina, a proteína da cadeia leve dos antígenos HLA da classe I, está localizada nas membranas celulares de todas as células que contenham núcleo. A beta-2-microglobulina é um bom indicador para a avaliação da progressão e terapia em doentes com mielomas múltiplos, a doença de Hodgkin, a leucemia linfática crónica e outros linfomas não-Hodgkin. Outras doenças com activação do sistema imune celular também induzem um aumento das concentrações de beta-2-microglobulina no soro. Além disso a beta-2-microglobulina é usada como marcador na avaliação da taxa de filtração glomerular, para diagnóstico e avaliação do decurso de transtornos renais túbulo-intersticiais, na avaliação da função renal após transplante de rim e ainda na avaliação da progressão de uma infecção HIV. Com o teste podem ser determinadas amostras de soro e de urina.

- Indicações:
- doenças linfáticas
  - alterações na filtração glomerular e tubular
  - danos tubulares renais por metais pesados (Cd, Hg)
  - rejeição de um rim transplantado

### Princípio do teste

As amostras diluídas são incubadas nas microplacas revestidas com anticorpo anti-humano beta-2-microglobulina. A beta-2-microglobulina, se presente na amostra, liga-se ao anticorpo. A parte não ligada é eliminada na etapa seguinte. Em seguida, as imunoglobulinas beta-2-microglobulina anti-humanas conjugadas com peroxidase de rábano (conjugado) são incubadas e reagem com a beta-2-microglobulina das amostras nas microplacas. O conjugado não ligado é eliminado na etapa seguinte. A adição de substrato TMB gera uma reação colorimétrica (azul) enzimática, que é parada com ácido diluído (mudança da cor para amarelo). A taxa de formação de cor do cromogénio depende da quantidade de conjugado ligado ao complexo antígeno-anticorpo, sendo dessa forma diretamente proporcional à respetiva beta-2-microglobulina na amostra do paciente.

### 3 Componentes do Kit

<b>DILUIR ANTES DE USAR</b>				
Item	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição/Conteúdo
Tampão de amostra (5x)	1 x 20ml	Branco	Amarelo	concentrado 5x Tris, cloreto de sódio (NaCl), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Tampão de lavagem (50x)	1 X 20ml	Branco	Verde	concentrado 50x Tris, NaCl, Tween 20, azido de sódio < 0.1% (conservante)
<b>PRONTO A USAR</b>				
Item	Quantidade	Cor da tampa	Cor da solução	Descrição/Conteúdo
Controlo negativo	1 x 1,5ml	Verde	Incolor	Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Controlo positivo	1 x 1,5ml	Vermelho	Amarelo	Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Calibradores	6 x 1,5ml	Branco	Amarelo *	Concentração de cada calibrador: 0, 0,75, 1,5, 3,0, 6,0, 12,0 µg/ml. Soro humano (diluído), albumina de soro bovino (BSA), azido de sódio < 0,1% (conservante)
Conjugado Anti-beta-2-Microglobulina-IgG humana policlonal de coelho	1 x 15ml	Azul	Azul	Contém: Imunoglobulinas anti-humanas marcadas com peroxidase de rábano (BSA)
Substrato TMB	1 x 15ml	Preto	Incolor	Tetrametilbenzidina estabilizada e peróxido de hidrogénio (TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )
Solução de paragem	1 x 15ml	Branco	Incolor	Ácido clorídrico 1M
Microplaca	12x8 poços	N/A	N/A	Fracçãoáveis. Revestimento ver ponto 1.
* Intensidade da cor aumenta com a concentração				
<b>MATERIAIS NECESSÁRIOS</b>				
Fotómetro para microplacas com filtro óptico para 450 nm, opcionalmente com filtro de referência opcional de 620 nm (600-690 nm). Material de vidro (cilindro 100-1000 ml), tubos de ensaio para as diluições. Agitador de tubos tipo Vortex, micropipetas (10,100, 200, 500, 1000 µl) ou multipipeta ajustável (100-1000µl). Aparelho de lavagem para microplacas (repetição 300 µl, pipeta multicanal ou sistema automatizado), papel de filtro. Os nossos testes foram concebidos para serem utilizados com água purificada segundo a definição da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP 26 – NF 21) e da Farmacopeia Europeia (Eur.Ph. 4. <sup>a</sup> ed.).				

### 4 Armazenamento e validade

Todos os reagentes e a microplaca devem ser guardados nas suas embalagens originais a 2-8°C/35-46°F. Soluções diluídas são estáveis durante 1 mês a 2-8°C/35-46°F. Devem ser cumpridas as datas de validade indicadas na embalagem e nos rótulos dos diferentes componentes.

Não usar componentes do kit que estejam fora do prazo de validade. Evite a exposição da solução de substrato TMB a luz intensa. Guarde as microplacas sempre fechadas dentro da sua película de embalagem, junto com o dessecante.



## 5 Avisos e medidas de precaução

### 5.1 Risco para a saúde

**ESTE PRODUTO DEVE SER USADO EXCLUSIVAMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO.** A aplicação tem de ser realizada por pessoal que tenha sido especialmente instruído e formado no uso de métodos de diagnóstico in vitro. Apesar de este produto não ser considerado como particularmente tóxico ou perigoso em condições de utilização, ver o que se segue para máxima segurança:

#### ***Recomendações e medidas de precaução***

Dado que alguns componentes do kit contêm reagentes potencialmente perigosos, estes podem causar uma irritação dos olhos e da pele.

**ATENÇÃO:** Calibradores, controlos e tampões contêm azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) como conservante.  $\text{NaN}_3$  pode ter efeito tóxico, se for ingerido ou absorvido através da pele ou dos olhos.  $\text{NaN}_3$  pode formar azidas metálicas altamente explosivas em contacto com canos de chumbo ou cobre. Para evitar concentrações de azida ao remover estas soluções deve-se passar com água em grande quantidade. É favor observar as prescrições locais/nacionais para descontaminação.

**Ao trabalhar com o kit não comer, beber ou fumar. Não pipetar com a boca. Usar luvas descartáveis.**

Os reagentes contidos neste produto, de origem humana (controlos e calibradores), demonstraram ser negativos após análise de antígeno de superfície da hepatite B (HbsAg), hepatite C e HIV 1 e 2. Contudo, em produtos de origem humana nunca se pode excluir com certeza definitiva a existência dos agentes patogénicos mencionados, outros ou de agentes eventualmente desconhecidos ou ainda não diagnosticados. Por isso os controlos, calibradores e soros dos doentes devem ser considerados transmissores potenciais de infecções e manuseados segundo as prescrições legais vigentes no seu país.

O kit contém material de origem animal conforme indicado no índice, manuseie segundo as prescrições legais vigentes no seu país.

### 5.2 Avisos gerais

Caso as informações sobre o produto, incluindo a rotulagem, tiverem erros ou estiverem incorrectas, contactar o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

Não misturar ou substituir controlos, calibradores, conjugados ou microplacas de diferentes números de lote. Isto pode levar a variações nos resultados.

Todos os componentes do kit devem atingir a temperatura ambiente (20-32°C/68-89,6°F) e ser bem agitados antes do teste.

É impreterível seguir o protocolo prescrito para a realização do teste.

**Incubação: Para a realização automática de testes recomendamos uma temperatura de 30°C/86°F.**

Nunca exponha os componentes do kit a temperaturas superiores a 37°C/98,6°F.

Pipete a solução de substrato sempre com pontas de pipeta novas para evitar contaminações. Proteja a solução de substrato de luz intensa. Nunca pipete o a solução do conjugado com pontas de pipeta que estejam contaminadas com outros reagentes.

**Um diagnóstico clínico definitivo não se deve basear somente nos resultados do teste realizado, mas deve ser elaborado pelo médico, tendo em conta todos os resultados clínicos e de laboratório. O diagnóstico deve ser impreterivelmente confirmado com diferentes métodos diagnósticos.**

## 6 Recolha da amostra, manipulação e armazenamento

---

Recomenda-se a utilização de amostras de soro colhidas na altura. A extracção de sangue deve seguir os requerimentos de protocolo do seu país. Não utilize amostras de soro ictéricas, lipémicas, hemolizadas ou contaminadas por bactérias.

Em caso de amostras turvas, as partículas devem ser centrifugadas a baixa velocidade (<1000 x g). As amostras de sangue devem ser tomadas em tubos limpos, secos e vazios. Após a separação, as amostras de soro devem ser utilizadas nas primeiras 8 horas, guardadas num local bem fechado até 48 horas a 2-8°C/35-46°F, se for necessário um armazenamento mais prolongado, devem ser congeladas a -20°C/-4°F.

## 7 Procedimento do teste

---

### 7.1 Preparação

#### **Diluição de reagentes concentrados:**

Dilua o tampão de amostra concentrado 1:5 com água destilada (p.ex. 20 ml mais 80 ml)

Dilua o tampão de lavagem concentrado 1:50 com água destilada (p.ex. 20 ml mais 980 ml).

Para evitar erros, sugerimos a marcação das tampas dos vários calibradores.

#### **Diluição das amostras dos doentes:**

Dilua e misture as amostras de soro 1:101 com tampão de amostra (1x),

p.ex. 1000 µl tampão de amostra + 10 µl de soro.

#### **Lavagem:**

São necessários 20 ml de tampão de lavagem diluído (1x) para 8 poços ou 200 ml para 96 poços p.ex. 4 ml de concentrado mais 196 ml de água destilada.

#### **Lavagem automatizada:**

Para a colocação em serviço do instrumento e o volume morto deve, ser consideradas quantidades adicionais de tampão de lavagem.

#### **Lavagem manual:**

Remova cuidadosamente o líquido ao bater a placa sobre papel filtrante. Pipete 300 µl de tampão de lavagem diluído em cada poço, espere 20 segundos. Repita o procedimento mais duas vezes.

#### **Microplacas:**

Retire os poços não usados, armazenando-os a 2-8°C/35-46°F de forma bem fechada dentro da película da embalagem, junto com o dessecante.

## 7.2 Schéma de pipetage

Sugerimos a pipetagem de calibradores, controlos e amostras da seguinte forma:

para interpretação quantitativa

	1	2	3	4...
A	Cal A	Cal E	P1	
B	Cal A	Cal E	P1	
C	Cal B	Cal F	P2	
D	Cal B	Cal F	P2	
E	Cal C	PC	P3	
F	Cal C	PC	P3	
G	Cal D	NC	...	
H	Cal D	NC	...	

CalA: calibrator A

CalB: calibrator B

CalC: calibrator C

CalD: calibrator D

CalE: calibrator E

CalF: calibrator F

PC: positive control

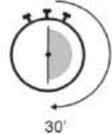
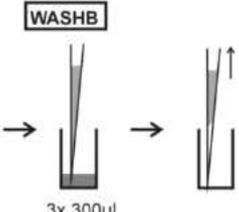
NC: negative control

P1: patient 1

P2: patient 2

P3: patient 3

## 7.3 Passos de teste

Pas so	Descrição
1.	Verifique se as preparações do passo 7.1 acima foram realizadas antes da pipetagem.
2.	Utilize os passos que se seguem de acordo com os resultados de interpretação quantitativa pretendidos:
<b>CONTROLOS E AMOSTRAS</b>	
3.	 <p>Pipete para os poços conforme descrito no ponto 7.2 acima, 100 µl de um dos seguintes:</p> <p>Calibradores (CAL.A a CAL.F) para interpretação <b>QUANTITATIVA</b> e 100 µl de cada um dos seguintes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Controlo negativo (NC) e Controlo positivo (PC) e</li> <li>• Soro diluído dos pacientes (P1, P2...)</li> </ul>
4.	 <p>Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.</p>
5.	 <p>Lave 3 vezes com 300 µl de tampão de lavagem 1:50 diluído.</p>



### CONJUGAR

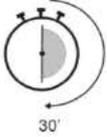
6.

CONJ



Pipete 100 µl de conjugado em cada poço.

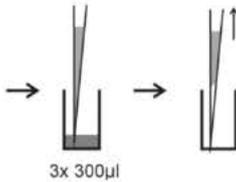
7.



Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F.

8.

WASHB



Lave 3 vezes com 300 µl de tampão de lavagem 1:50 diluído.

### SUBSTRATO

9.

SUB



Pipete 100 µl de substrato TMB em cada poço.

10.

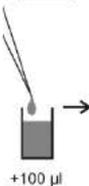


Incube durante 30 minutos a 20-32°C/68-89,6°F, protegida de luz intensa.

### PARAGEM

11.

STOP



Pipete 100 µl da solução de paragem dentro de cada poço, na mebeta-2-Microglobulina sequência da pipetagem do substrato.

12.

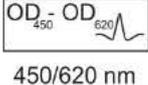


Incube durante 5 minutos, no mínimo.

13.

Agite cuidadosamente a placa durante 5 segundos.

14.



450/620 nm

Leia a densidade óptica a 450 nm dentro de 30 minutos (recomendável a 450/620 nm).

## 8 Interpretação quantitativa

A interpretação quantitativa realiza-se com base numa curva padrão, em que a densidade óptica dos calibradores (eixo y) é traçada contra a concentração em µg/ml (eixo x). É recomendada uma escala log/lin e um ajuste de 4 parâmetros para a interpretação. Com base na curva é determinada a concentração de anticorpos em µg/ml a partir da densidade óptica da amostra.

	Intervalo de normalidade	Resultados positivos
amostras de urina	< 0,3 µg/ml	> 0,3 µg/ml
soro ou plasma	< 3,0 µg/ml	> 3,0 µg/ml

### Exemplo de interpretação

Este exemplo **NÃO** pode ser usado para interpretar os resultados dos pacientes

Calibradores	DO 450/620 nm	CV % (Variância)
0,0 µg/ml	0,049	3,1
0,75 µg/ml	0,480	2,1
1,5 µg/ml	0,845	1,7
3,0 µg/ml	1,335	1,6
6,0 µg/ml	1,720	0,3
12,0 µg/ml	2,023	3,1

### Exemplo de cálculo

Paciente	Replicado (OD)	Valor médio (OD)	Resultado (µg/ml)
P 01	0,515/0,531	0,523	0,84
P 02	1,708/1,716	1,722	6,03

As amostras acima da gama do calibrador mais elevado devem ser referidas como >Max. Devem ser diluídas conforme necessário voltar a realizar o ensaio. As amostras abaixo da gama do calibrador devem ser referidas como < Min.

Consulte o certificado de controlo junto para dados específicos do lote. Laboratórios médicos devem realizar um controlo de qualidade interno, utilizando controlos próprios e/ou um „pool“ de soros interno segundo os regulamentos da UE.

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais, com base nas suas próprias técnicas, controlos, equipamento e população de doentes.

No caso dos valores dos controlos não cumprirem os critérios, o teste é inválido e deverá ser repetido.

Devem verificar-se as seguintes questões técnicas: Prazo de validade dos reagentes (preparados), condições de armazenamento, pipetas, aparelhos, fotómetro, condições de incubação e métodos de lavagem.

Se os itens testados mostrarem valores aberrantes ou qualquer tipo de desvio ou se os critérios de avaliação não forem cumpridos sem causa plausível, contactar o fabricante ou o fornecedor do kit de teste.

## 9 Dados Técnicos

Amostra:	soro
Volume de amostra:	0 µl de soro ou plasma para Diluição 1:101 com 1x tampão de amostra 100 µl de urina para Diluição 1:11 com 1x tampão de amostra
Tempo total de incubação:	90 minutos à temperatura 20-32°C/68-89,6°F
Intervalo de calibração:	0-12 µg/ml
Sensibilidade analítica:	0,1 µg/ml
Armazenamento:	a 2-8°C/35-46°F utilize apenas os frascos originais
Número de determinações:	96 tests

## 10 Dados do teste / Características do teste

### 10.1 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica de AESKULISA beta-2-Microglobulin de 0,1 µg/ml foi determinada ao testar 30 vezes o tampão de amostra.

### 10.2 Especificidade e sensibilidade

A microplaca está revestida com anticorpos beta-2-microglobulina anti-humanos altamente purificados. Não foram encontradas reactividades cruzadas com outros antígenos.

### 10.3 Linearidade

Foram analisados com este kit soros seleccionados e determinou-se que deviam diluir-se linearmente. No entanto, devido à natureza heterogénea dos auto-anticorpos humanos, podem existir amostras que não sigam esta regra.

Amostra No.	Factor de Diluição	Concentração medida (µg/ml)	Concentração esperada (µg/ml)	Recuperação (%)
1	1 / 100	11,9	12,0	99,2
	1 / 200	6,1	6,0	101,6
	1 / 400	2,9	3,0	96,7
	1 / 800	1,4	1,5	93,3
2	1 / 100	6,1	6,0	101,6
	1 / 200	3,1	3,0	103,3
	1 / 400	1,5	1,5	100,0
	1 / 800	0,7	0,75	93,3

## 10.4 Precisão

Para determinar a precisão do ensaio, avaliou-se a variabilidade (intra e inter-ensaio) através da análise da sua reprodutibilidade em três amostras de soro. Estas amostras foram selecionadas para representar um intervalo acima da curva padrão.

Intra-Ensaio		
Amostra No.	Valor médio (µg/ml)	CV (%)
1	8,0	3,9
2	4,6	4,1
3	2,3	2,8

Inter-Ensaio		
Amostra No.	Valor médio (µg/ml)	CV (%)
1	7,9	4,4
2	4,8	5,2
3	2,5	3,5

## 10.5 Calibração

Devido à não existência de uma calibração de referência internacional, este ensaio está calibrado em unidades arbitrárias (µg/ml).

## 11 Bibliografia

**Bernard A, Buchet JP, Roels H, Masson P, Lauwerys R. R.** Renal excretion of proteins and enzymes in workers exposed to cadmium. Eur J Clin Invest. 1979 Feb;9(1):11-22.

**Morell A, Riesen W.** Serum beta 2-microglobulin, serum creatinine and bone marrow plasma cells in benign and malignant monoclonal gammopathy. Acta Haematol. 1980;64(2):87-93.

**Camara NO, Nishida S, Silva MS, Pestana JO, Pereira AB, Sesso R, Pacheco-Silva A.** Monitoring serum beta-2 microglobulin is useful for detecting patients with increased risk of acute rejection during reduction in immunosuppression. Transplant Proc. 1998 Dec;30(8):4158-9.



<b>IVD</b>	- Diagnosi in vitro	- For in vitro diagnostic use
	- Pour diagnostic in vitro	- Para uso diagnóstico in vitro
	- In Vitro Diagnostikum	- In Vitro Διαγνωστικό μέσο
	- Para uso Diagnóstico in vitro	
<b>REF</b>	° Numero d'ordine	° Catalogue number
	° Référence Catalogue	° Numéro de catálogo
	° Bestellnummer ° Número de catálogo	° Αριθμός παραγγελίας
<b>LOT</b>	° Descrizione lotto	° Lot
	° Lot	° Lote
	° Chargen Bezeichnung ° Lote	° Χαρακτηρισμός παρτίδας
<b>CE</b>	° Conformità europea	° EC Declaration of Conformity
	° Déclaration CE de Conformité	° Declaración CE de Conformidad
	° Europäische Konformität	° Ευρωπαϊκή συμφωνία
	° Declaração CE de Conformidade	
	° 96 determinazioni	° 96 tests
	° 96 tests	° 96 pruebas
	° 96 Bestimmungen	° 96 προσδιορισμοί
	° 96 Testes	
	° Rispettare le istruzioni per l'uso	° See instructions for use
	° Voir les instructions d'utilisation	° Ver las instrucciones de uso
	° Gebrauchsanweisung beachten	° Λάβετε υπόψη τις οδηγίες χρήσης
	° Ver as instruções de uso	
	° Da utilizzarsi entro	° Use by
	° Utilise avant le	° Utilizar antes de
	° Verwendbar bis	° Χρήση μέχρι
	° Utilizar antes de	
	° Conservare a 2-8°C	° Store at 2-8°C (35-46°F)
	° Conserver à 2-8°C	° Conservar a 2-8°C
	° Lagerung bei 2-8°C	° Φυλάσσεται στους 2-8°C
	° Conservar entre 2-8°C	
	° Prodotto da	° Manufactured by
	° Fabriqué par	° Fabricado por
	° Hergestellt von	° Κατασκευάζεται από
	° Fabricado por	
<b>CO-CAL</b>	° Calibratore cut-off	° Cut off Calibrator
	° Etalon Seuil	° Calibrador de cut-off
	° Grenzwert Kalibrator	° Οριακός ορός Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
	° Calibrador de cut-off	
<b>CON+</b>	° Controllo positivo	° Positive Control
	° Contrôle Positif	° Control Positivo
	° Positiv Kontrolle	° Θετικός ορός ελέγχου
	° Controllo positivo	
<b>CON-</b>	° Controllo negativo	° Negative Control
	° Contrôle Négatif	° Control Negativo
	° Negativ Kontrolle	° Αρνητικός ορός ελέγχου
	° Controllo negativo	
<b>CAL</b>	° Calibratore	° Calibrator
	° Etalon	° Calibrador
	° Kalibrator	° Αντιδραστήριο βαθμονόμησης
	° Calibrador	
<b>RC</b>	° Recupero	° Recovery
	° Corrélation	° Recuperado
	° Wiederfindung	° Ανάκτηση
	° Recuperação	
<b>CONJ</b>	° Coniugato	° Conjugate
	° Conjugé	° Conjugado
	° Konjugat	° Σύζευγμα
	° Conjugado	
<b>MP</b>	° Micropiastra rivestita	° Coated microtiter plate
	° Microplaque sensibilisée	° Microplaca sensibilizada
	° Beschichtete Mikrotiterplatte	° Επικαλυμμένη μικροπλάκα
	° Microplaca revestida	
<b>WASHB 50x</b>	° Tampone di lavaggio	° Wash buffer
	° Tampon de Lavage	° Solución de lavado
	° Waschpuffer	° Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης
	° Solução de lavagem	
<b>SUB</b>	° Tampone substrato	° Substrate buffer
	° Substrat	° Tampón sustrato
	° Substratpuffer	° Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
	° Substrato	
<b>STOP</b>	° Reagente bloccante	° Stop solution
	° Solution d'Arrêt	° Solución de parada
	° Stopreagenz	° Αντιδραστήριο διακοπής αντίδρασης
	° Solução de paragem	
<b>SB 5x</b>	° Tampone campione	° Sample buffer
	° Tampon Echantillons	° Tampón Muestras
	° Probenpuffer	° Ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων
	° Diluente de amostra	