

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра
Е.Л.Богдан
«26» августа 2020 г.
Регистрационный № 077-0820

**МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ В2 –
МИКРОГЛОБУЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И МОЧЕ**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет»,
учреждение здравоохранения «2-я городская детская клиническая
больница» г.Минска

АВТОРЫ: к.м.н., доцент Козыро И.А., д.м.н., профессор, академик
НАН Беларуси Сукало А.В., Белькевич А.Г., Тур Н.И.

Минск, 2020

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкции) изложены методы определения содержания β_2 – микроглобулина (β_2 -МГ) в сыворотке крови и моче, которые могут быть использованы в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику наследственных нефропатий и нарушений, развивающихся в результате дисфункции почечных канальцев.

Инструкция предназначена для врачей-педиатров, врачей-нефрологов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих помощь пациентам, страдающим заболеваниями органов мочевыводящей системы, в частности, наследственными болезнями почек с поражением клубочкового (наследственный нефрит) и канальцевого (тубулопатии) аппарата, в стационарных и амбулаторных условиях, условиях отделения дневного пребывания.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

N07 (наследственная нефропатия, не классифицированная в других рубриках), Q87.8 (другие уточненные синдромы врожденных аномалий, не классифицированные в других рубриках), N25 (нарушения, развивающиеся в результате дисфункции почечных канальцев).

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

1. Лабораторная посуда: бесцветные, полипропиленовые пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 ml, многоканальный дозатор объемом 100 μ l, пипетки на 10, 100 и 1000 μ l, мерный цилиндр объемом 100 и 1000 ml

2. Многоместный вихрекс с диапазоном скорости от 1200 до 2400 об/мин
3. Холодильник бытовой (2-8⁰С) с морозильной камерой (-20⁰С)
4. Дистиллированная или деионизированная вода
5. Иммуноферментный анализатор с микропланшетным ридером с диапазоном длин волн 400 -750 нм
6. Лабораторный таймер
7. Набор реагентов для определения содержания β_2 – МГ в сыворотке крови и моче

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ β_2 – МИКРОГЛОБУЛИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

1. Получение биологического материала

Получение венозной крови и сыворотки осуществляется согласно общепринятым методам забора, хранения и транспортировки образцов биологических сред.

2. Подготовка реагентов

Промывочный раствор: перед использованием содержимое одной пробирки (20 ml) с буферным промывочным раствором развести с дистиллированной водой до конечного объема 1000 ml.

Образцовый буфер: перед использованием развести содержимое одной пробирки (20 ml) образцового буфера дистиллированной водой до объема 100 ml.

3. Приготовление образцов

Разведение сыворотки проводится в соотношении 1:100. Для этого 10 μ l сыворотки необходимо добавить к 990 μ l образцового буфера.

4. Определение содержания $\beta 2$ – МГ и подсчет результатов

- 1) Приготовить достаточное количество микромодулей для всех калибраторов, контролей и образцов пациентов.
- 2) Распределить 100 μl калибраторов, контролей и предварительно приготовленных образцов в ячейки.
- 3) Инкубировать 30 минут при комнатной температуре (20-28 °С).
- 4) Удалить содержимое ячеек и промыть 3 раза 300 μl промывочного раствора.
- 5) Распределить 100 μl ферментного конъюгата в каждую ячейку.
- 6) Инкубировать 15 минут при комнатной температуре.
- 7) Удалить содержимое ячеек и промыть 3 раза 300 μl промывочного раствора.
- 8) Распределить 100 μl ТМВ - раствора в каждую ячейку.
- 9) Инкубировать 15 минут при комнатной температуре.
- 10) Добавить 100 μl стоп-раствора в каждую ячейку.
- 11) Инкубировать 5 минут при комнатной температуре.
- 12) Прочитать оптическую плотность при 450 нм и посчитать результат.
- 13) Для получения количественных результатов необходимо построить график зависимости оптической плотности каждого калибратора от его концентрации для построения калибровочной кривой. Концентрация образцов пациентов может быть затем оценена по калибровочной кривой путем интерполяции.

5. Предполагаемые значения

Установлены следующие нормальные референтные значения $\beta 2$ – МГ в сыворотке крови: 0-3 мг/л.

6. Практическое применение метода

Определение содержания β_2 – МГ в сыворотке крови у нефрологических пациентов может быть информативно для оценки степени повреждения нефрона и диагностики хронической болезни почек (ХБП). Содержание сывороточного β_2 - МГ ≥ 3 мг/л позволяет диагностировать ХБП у пациентов с наследственным нефритом и тубулопатиями, когда основные показатели, используемые в настоящее время (креатинин, СКФ, протеинурия) остаются в пределах возрастной нормы. Определение данного биомаркера имеет высокую диагностическую эффективность: чувствительность – 100%, специфичность-99,9%.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ β_2 – МИКРОГЛОБУЛИНА В МОЧЕ

1. Получение биологического материала

Получение образцов мочи осуществляется согласно общепринятым методам забора, хранения и транспортировки образцов биологических сред.

2. Подготовка реагентов

Промывочный раствор: перед использованием содержимое одной пробирки с буферным промывочным раствором развести с дистиллированной водой до конечного объема 1000 ml.

Образцовый буфер: перед использованием развести содержимое одной пробирки (20 ml) образцового буфера дистиллированной водой до объема 100 ml.

3. Приготовление образцов

Разведение мочи проводится в соотношении 1:10. Для этого 100 μl мочи необходимо добавить к 900 μl образцового буфера.

4. Определение содержания $\beta 2$ – МГ и подсчет результатов

- 1) Приготовить достаточное количество микромодулей для всех калибраторов, контролей и образцов пациентов.
- 2) Распределить 100 μl калибраторов, контролей и предварительно приготовленных образцов в ячейки.
- 3) Инкубировать 30 минут при комнатной температуре (20-28 $^{\circ}\text{C}$).
- 4) Удалить содержимое ячеек и промыть 3 раза 300 μl промывочного раствора.
- 5) Распределить 100 μl ферментного конъюгата в каждую ячейку.
- 6) Инкубировать 15 минут при комнатной температуре.
- 7) Удалить содержимое ячеек и промыть 3 раза 300 μl промывочного раствора.
- 8) Распределить 100 μl ТМВ - раствора в каждую ячейку.
- 9) Инкубировать 15 минут при комнатной температуре.
- 10) Добавить 100 μl стоп-раствора в каждую ячейку.
- 11) Инкубировать 5 минут при комнатной температуре.
- 12) Прочитать оптическую плотность при 450 нм и посчитать результат.
- 13) Для получения количественных результатов необходимо построить график зависимости оптической плотности каждого калибратора от его концентрации для построения калибровочной кривой. Концентрация образцов пациентов может быть затем оценена по калибровочной кривой путем

интерполяции.

5. Предполагаемые значения

Установлены следующие нормальные референтные значения $\beta 2 - \text{МГ}$ в моче: 0-0,3 мг/л.

6. Практическое применение метода

Определение содержания $\beta 2 - \text{МГ}$ в моче у пациентов с болезнями мочевыделительной системы может быть информативно для оценки степени повреждения нефрона и диагностики ХБП. Содержание мочевого $\beta 2 - \text{МГ} \geq 0,3$ мг/л позволяет диагностировать ХБП у пациентов с наследственным нефритом и тубулопатиями, когда основные показатели, используемые в настоящее время, остаются в пределах возрастной нормы. Определение содержания $\beta 2 - \text{МГ}$ в моче является не инвазивным методом диагностики повреждения почек и ХБП, что обеспечивает отсутствие осложнений, которые могут возникать при заборе крови у пациента. Определение данного биомаркера имеет высокую диагностическую эффективность: чувствительность – 100%, специфичность-99,9%.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ОШИБОК

Осложнений при применении данных методов не зарегистрировано.

Ошибки могут отмечаться на этапах получения биологического материала, подготовке реагентов и приготовлении образцов. На первом этапе к ошибкам могут приводить: прием пациентами лекарственных средств, которые могут повлиять на забор крови и мочи, получение биологического материала после проведения других диагностических процедур. Неправильное разведение реагентов и образцов могут привести к ложным количественным данным при проведении определения содержания маркера и подсчете результатов.

Во избежание подобных ошибок при проведении исследований необходимо строго следовать всем методическим требованиям.