

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный Директор
АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»

Е.Н. Схолль-Энгбертс

2017 г.



**ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ФЕРРИТИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА
»Ферритин-Имаксиз (IMAXYZ)«**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов для количественного иммуноферментного определения ферритина в сыворотке крови человека «Ферритин-Имаксиз (IMAXYZ)» предназначен для количественного *in vitro* определения концентрации ферритина в сыворотке крови человека.

1.2. Ферритин – водорастворимый белок, имеющий молекулярную массу около 440 кДа и состоящий из двух компонентов: апоферритина (24 субъединицы двух видов: Н (heavy) и L(light)) и коллоидного гидроксида железа.

Ферритин синтезируется клетками различных тканей: печени, селезенки, костного мозга, сердечной мышцы, легких, почек, щитовидной железы, плаценты, тонкого кишечника, поджелудочной железы, а также лейкоцитами.

Наиболее хорошо изучена железодепонирующая роль ферритина печени, позволяющего организму сохранять железо в нетоксичной, растворимой и легкодоступной форме, из которой оно может быть мобилизовано для синтеза гемоглобина и негемовых железосодержащих белков. В физиологических условиях биосинтез апоферритина стимулируется железом. При гемохроматозе и гемосидерозе, в ситуациях, связанных с перегрузкой организма железом, количество ферритина растет, а при дефиците железа происходит супрессия синтеза апоферритина и его количество снижается.

В сыворотке крови ферритин находится в незначительных количествах, причем в физиологических условиях уровень сывороточного ферритина коррелирует с запасами железа в организме,

поэтому он используется в качестве оценочного показателя в клинической практике. Считается, что этот показатель является наиболее ранним и достоверным признаком тканевого дефицита железа, предшествующего развитию железодефицитной анемии. Измерения ферритина в сыворотке имеет важное значение в мониторинге запаса железа у беременных женщин, доноров крови и у пациентов, регулярно проходящих процедуру гемодиализа.

Изменение уровня ферритина в крови может наблюдаться при состояниях не связанных с изменением уровня железа, таких как воспалительные или инфекционные процессы, хронические заболевания печени, гепатоцеллюлярный рак, рак молочной железы и при ряде других заболеваний.

1.3. Набор «Ферритин-Имаксиз (IMAXYZ)» рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора тетраметилбензидина (ТМБ) при использовании всех стрипов одновременно. Всего – 96 определений.

В случае дробного применения необходима обязательная постановка всех калибровочных проб для каждого отдельного анализа.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

В наборе «Ферритин-Имаксиз (IMAXYZ)» использована технология количественного «сэндвич» - варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта на внутренней поверхности лунок микропланшетов иммобилизованы моноклональные антитела к ферритину. Другие моноклональные антитела к ферритину конъюгированы с пероксидазой. Во время инкубации происходит связывание ферритина, содержащегося в образцах, контрольных материалах и калибровочных пробах, с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и взаимодействие связавшегося ферритина с моноклональными антителами, мечеными пероксидазой. Оба моноклональных антитела имеют разную эпитопную специфичность к ферритину, что позволяет использовать их для реализации одностадийного высокоспецифичного анализа.

По окончании инкубации во время промывки происходит удаление всех несвязавшихся компонентов из зоны реакции.

Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание в синий цвет раствора в лунках с пробами, содержащими ферритин. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации ферритина в анализируемых образцах, калибровочных пробах и контрольных материалах.

После остановки реакции стоп-реагентом (цвет раствора меняется с синего на желтый) и измерения оптической плотности (ОП) раствора в лунках, проводится расчет концентрации ферритина в исследуемых образцах и контрольных материалах по калибровочному графику.

Калибровочный график строится на основании результатов анализа калибровочных проб, участвующих в анализе одновременно с исследуемыми образцами.

3. СОСТАВ НАБОРА

МИКРОПЛАНШЕТ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ К ФЕРРИТИНУ

1 упаковка

Разборный полистирольный микропланшет со стрипами, разделяемыми на отдельные лунки, с иммобилизованными мышинными моноклональными антителами к ферритину, маркирован «Микропланшет с моноклональными антителами к ферритину».

КОНЬЮГАТ

1 флакон, 24 мл

Конъюгат моноклональных антител к ферритину с пероксидазой, маркирован «Конъюгат».

КАЛИБРОВОЧНЫЕ ПРОБЫ (КП)

комплект

Аттестованы по стандарту WHO 3d IS 94/572, содержат известные количества ферритина.

КП№1- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 0 нг/мл ферритина, маркирован «Калибровочная проба №1».

КП№2- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 10 нг/мл ферритина, маркирован «Калибровочная проба №2».

КП№3- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 50 нг/мл ферритина, маркирован «Калибровочная проба №3».

КП№4- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 100 нг/мл ферритина, маркирован «Калибровочная проба №4».

КП№5- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 400 нг/мл ферритина, маркирован «Калибровочная проба №5».

КП№6- 1 флакон, 0,5 мл, содержит 1000 нг/мл ферритина, маркирован «Калибровочная проба №6».

КОНТРОЛЬНАЯ СЫВОРОТКА (КС)

1 флакон. 0.5 мл

Аттестована по Международному стандарту WHO 3d IS 94/572; маркирована «Контрольная сыворотка», содержит известное количество ферритина, диапазон концентраций указан на этикетке флакона.

ПРИМЕЧАНИЕ: точные значения калибровочных проб и диапазон контрольной сыворотки указаны на этикетках флаконов и в паспорте к набору реагентов.

БУФЕР Р

1 флакон. 3.0 мл

Для разведения образцов сыворотки крови, Водно-солевой раствор, маркирован «Буфер Р»

РАСТВОР ТМБ

1 флакон. 14 мл

Раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ».

СТОП-РЕАГЕНТ

1 флакон. 14 мл

1М соляная кислота, маркирован «Стоп-реагент».

БУФЕР П

1 флакон. 20 мл

Концентрированный водно-солевой раствор для промывки лунок (20-кратный концентрат), маркирован «Буфер П».

Принадлежности:

- пакет полиэтиленовый закрывающийся – 1 штука;
- пленка для заклеивания микропланшета – 1 штука.

4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА.

4.1. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ферритина в сыворотке крови человека не превышает 5 нг/мл.

4.2. Специфичность. Перекрестной реакции обоих моноклональных антител к сывороточному альбумину, альфа-фетопротеину, трансферрину, гемоглобину, сывороточному железу не обнаружено.

4.3. Линейность. Зависимость концентрации ферритина в образцах сыворотки крови при разведении «Калибровочной пробой

№1», имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2 – № 6 и составляет 90-110%.

4.4. Точность. Соответствие измеренной концентрации ферритина в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы № 3, составляет 90–110%.

4.5. Коэффициент вариации результатов определения ферритина в одном и том же образце с использованием набора «Ферритин-Имаксиз (IMAXYZ)» не превышает 8%.

4.6. Хук-эффект высоких концентраций. В наборе реагентов «Ферритин-Имаксиз (IMAXYZ)» хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации 17000 МЕ/мл.

4.7. Набор реагентов содержит специальные добавки, позволяющие исключить влияние на результаты анализа анти-мышинных антител (НАМА) и гетерофильных антител. Однако чрезвычайно высокие концентрации НАМА и гетерофильных антител могут повлиять на результаты анализа.

4.8. Клиническая проверка. Концентрация ферритина была измерена в сыворотках крови 215 здоровых людей (из них – 99 мужчин, 116 женщин). Результаты измерений приведены в таблице:

	Ферритин (нг/мл)
Мужчины	20-300
Женщины	10-150

При использовании набора рекомендуется уточнить значения концентраций ферритина, соответствующие нормальным, с учетом особенностей популяции.

4.9. Аналитические характеристики метода исследования, используемого в наборе «Ферритин-Имаксиз (IMAXYZ)», (точность, чувствительность, линейность, воспроизводимость результатов измерения) установлены в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53022.2-2008.

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ.

5.1. Реагенты, входящие в состав набора, предназначены исключительно для лабораторной in vitro диагностики.

5.2. Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

5.3. В учреждениях, в которых осуществляется работа с наборами реагентов, следует соблюдать ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

5.4. Несмотря на то, что производные крови человека, входящие в состав наборов, были проверены на наличие антител к ВИЧ 1 и 2 типа, вирусу гепатита С, а также HBsAg и дали отрицательный результат, с калибраторами, контрольными материалами необходимо обращаться как с образцами, несущими инфекционную опасность, так как ни один существующий метод тестирования не может на 100% гарантировать отсутствие инфекционных агентов.

5.5. При работе с исследуемыми образцами пациентов следует соблюдать меры предосторожности как в отношении инфекционно опасного материала. Настоятельно рекомендуется использование одноразовых перчаток и других рекомендованных мер защиты (спецодежду), позволяющих снизить риск инфицирования.

5.6. Все материалы, контактировавшие с образцами крови пациентов, контрольными и калибровочными материалами должны быть инаktivированы официально регламентированными методами (автоклавированием в течение 1 часа при 121°C, замачиванием в 5% растворе хлорамина Б в течение 1 часа или обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом). Жидкие отходы, включая промывочные воды, должны быть инаktivированы добавлением сухого хлорамина Б из расчета 50 г/л в течение 2 часов, либо обработкой в соответствии с инструкцией каким-либо иным лабораторным дезинфектантом.

5.7. Стоп-реагент представляет собой 1 М раствор соляной кислоты и обладает раздражающим действием на кожу и слизистые оболочки. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

5.8. Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами реагентов.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Одно- или многоканальные дозаторы с изменяемым объемом отбора жидкостей в диапазонах 10 – 100 мкл, 50 – 300 мкл для постановки анализа и в диапазонах 100 – 1000 мкл, 1000 – 5000 мкл, 1000 – 10000 мкл для приготовления реагентов.
- Одноразовые сменные наконечники для дозаторов.
- Ванночки для реактивов для многоканального дозатора.
- Спектрофотометр, позволяющий производить измерение оптической плотности раствора в лунках при 450 нм.
- Автоматический промыватель для планшетов или дозирующее устройство.
- Фильтровальная бумага.
- Цилиндр мерный на 200 мл.
- стакан стеклянный вместимостью 500 мл.
- Вода деионизованная или дистиллированная.
- Перчатки резиновые или пластиковые.

7. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ.

7.1. Взятие крови для анализа следует проводить с использованием стандартных процедур для венозной крови, а образцы сыворотки должны быть освобождены от клеток крови центрифугированием. После центрифугирования сыворотка крови должна быть перенесена в отдельную пробирку.

7.2. Следует избегать использования в анализе плазмы крови, гемолизированной или мутной сыворотки.

7.3. Не допускается использование в качестве консерванта азида натрия.

7.4. Образцы сыворотки крови следует использовать в течение 24 часов с момента получения при условии их хранения при +2...8°C. Если тестирование откладывается более, чем на 24 часа, сыворотку следует отделить от сгустка и хранить при +2...8°C не более 7 суток. Для более длительного хранения образцы необходимо заморозить при температуре ниже -20°C. Избегать повторного замораживания образцов.

8. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА.

8.1. Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C).

8.2. Предварительное разведение исследуемых образцов. Если значения ферритина в исследуемых образцах по предварительным данным выше значения концентрации калибровочной пробы № 6, образцы следует развести Буфером Р в 10 раз:

- 180 мкл Буфера Р + 20 мкл исследуемого образца.

Тщательно перемешать. Разведение сывороток крови пациентов следует проводить только непосредственно перед проведением анализа. Хранение разведенных образцов не допускается.

8.3. Микропланшет. Перед вскрытием пакет необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) не менее 30 минут во избежание конденсации влаги на поверхности лунок. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов или лунок. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

8.4. Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

8.5. Буфер П. Необходимое количество промывочного буфера развести дистиллированной водой в 20 раз.

Например:

10 мл Буфера П + 190 мл деионизованной или дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Готовый к использованию Буфер П хранить закрытым при комнатной температуре (+18...25°C) не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным 20-кратный Буфер П хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности

8.6. Конъюгат анти-ферритин-пероксидаза готов к использованию.

8.7. Буфер Р готов к использованию.

8.8. Раствор ТМБ готов к использованию.

8.9. Стоп-реагент готов к использованию.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

9.1. Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ТМЕ	ТМЕ	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
B	КП1	КП1	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
C	КП2	КП2	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
D	КП3	КП3	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
E	КП4	КП4	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
F	КП5	КП5	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
G	КП6	КП6	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
H	КС	КС	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

9.2. Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах. *Общее время внесения калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов не должно превышать 15 минут во избежание получения неправильных результатов исследования.*

9.3. Во все лунки, кроме A1 и A2, внести по 200 мкл Конъюгата.

9.4. Аккуратно перемешать содержимое лунок постукиванием по краю планшета в течение 1-2 минут.

9.5. Заклеить микропланшет специальной пленкой, входящей в состав набора.

9.6. Инкубировать стрипы при комнатной температуре (+18-25°C) без встряхивания в течение 30 мин.

9.7. По окончании инкубации удалить содержимое лунок в специальную емкость для сбора инфицированного материала и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п. 8.4, с последующим удалением жидкости в емкость для инфицированного материала. По окончании промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом

положении по фильтровальной бумаге до исчезновения следов наличия жидкости в лунках стрипов.

9.8. Внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте при комнатной температуре (+18...25°C) в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

9.9. Остановить ферментную реакцию добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-реагента. Цвет реакционной смеси в лунках должен измениться с синего на желтый. Время между остановкой реакции и измерением ОП не должно превышать 20 минут.

Схема проведения анализа приведена на **Рисунке 1**.

10. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.

10.1. Измерить на фотометре вертикального сканирования ОП раствора в лунках при длине волны 450 нм.

10.2. Определить среднее значение ОП в лунках A1 и A2 (контроль ТМБ) и вычесть его из среднего значения ОП калибровочных проб, контрольной сыворотки и анализируемых образцов.

11. УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ.

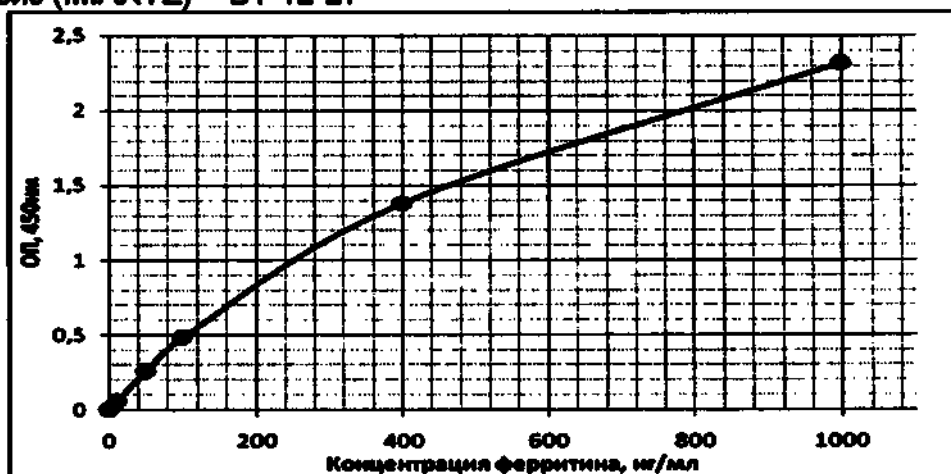
11.1. Результаты анализа следует учитывать, если среднее значение ОП в лунках A1 и A2 не превышает 0,1 ед.ОП.

11.2. В линейных координатах построить график зависимости ОП (ед.опт.плотн.) от концентрации ферритина в калибровочных пробах (нг/мл), используя средние значения ОП дубликатов.

11.3. При наличии автоматической программы расчета на фотометре в качестве метода аппроксимации калибровочной кривой выбрать метод 4PL, 5PL или кубический сплайн.

11.4. Определить содержание ферритина в исследуемых образцах и контрольной сыворотке по калибровочному графику, используя среднее значение ОП для дубликатов. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию ферритина умножить на фактор разведения.

Ниже приведен типичный график зависимости ОП калибровочных проб от концентрации в них ферритина. Данный график приведен исключительно в целях иллюстрации и не может быть использован для расчета концентрации ферритина в образцах сывороток пациентов:



12. ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНАЛИЗА.

12.1. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что количество независимых экспериментов ограничено объемом калибровочных проб.

12.2. Для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и определение концентрации аналита в контрольной сыворотке.

12.3. Не допускается использование реагентов разных серий при проведении анализа, а также использование ТМБ, стоп-реагента и промывочного буфера других фирм-производителей.

12.4. После окончания внесения реагентов необходимо плотно закрыть крышки флаконов и поместить их на хранение при температуре +2...8°C.

13. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ, ТРАНСПОРТИРОВКИ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА.

13.1. Набор для количественного иммуноферментного определения ферритина в сыворотке крови человека «Ферритин-Имаксиз (IMAXYZ)» должен храниться и транспортироваться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение и транспортировка набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Габаритные размеры набора - 165×130×100 мм, вес нетто – 200 г., вес брутто – 300 г.

Срок годности набора — 18 месяцев. / До окончания срока годности набора, при условии соблюдения температурного режима

хранения, транспортировки и применения, производитель гарантирует работоспособность набора и соответствие всех аналитических и диагностических характеристик набора заявленным. Не допускается использование серии набора по истечении срока ее годности.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо после вскрытия хранить следующим образом:

- Микропланшет со стрипами хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности;
- Конъюгат и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 2 месяцев при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$;
- Калибровочные пробы и контрольную сыворотку, «Буфер Р», после вскрытия хранить не более 2 месяцев при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$. Для длительного хранения (в течение срока годности) заморозить при температуре ниже -20°C .
- Буфер П и стоп-реагент после вскрытия флаконов хранить при температуре $+2...8^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности.
- Буфер П, готовый к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре ($+18...25^{\circ}\text{C}$). Не добавлять в емкость с используемым Буфером П вновь приготовленный раствор.

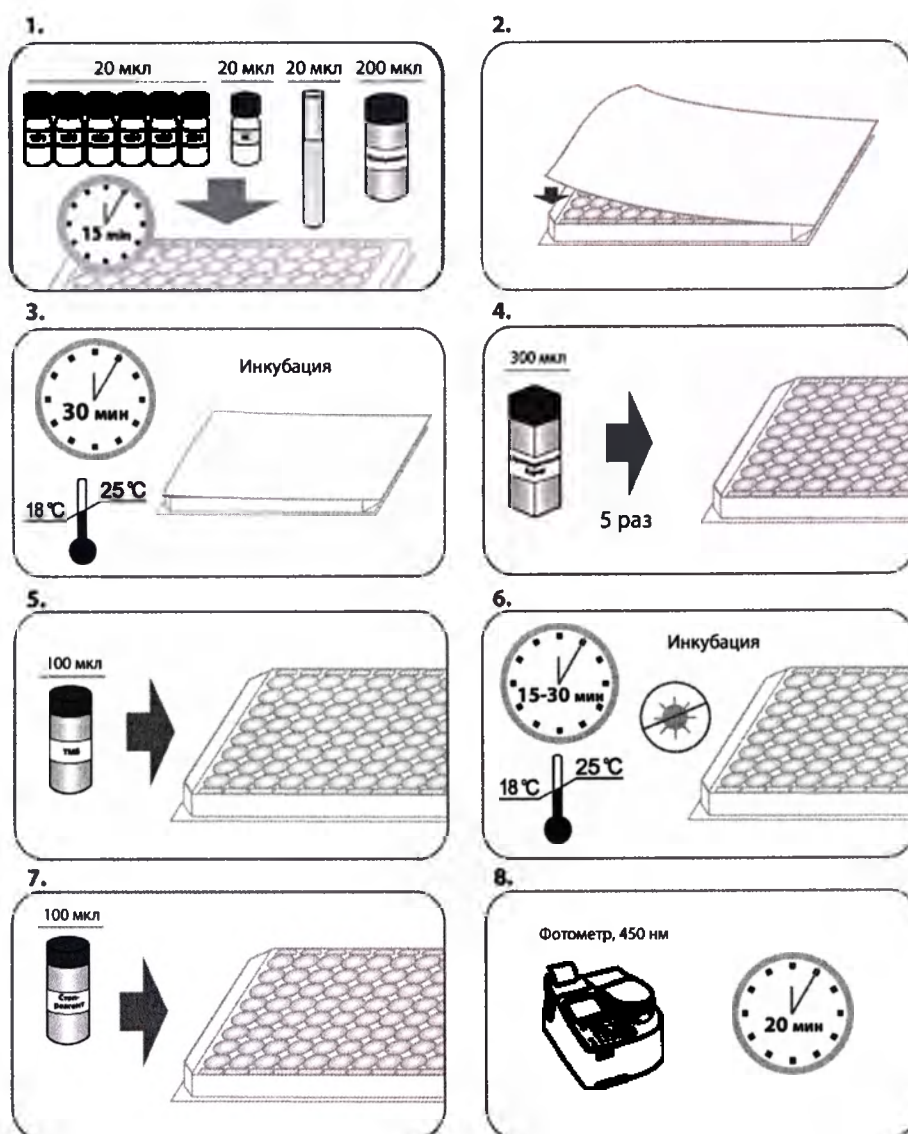
13.2. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции. Любые отклонения от рекомендованных процедур проведения анализа и приготовления реагентов могут привести к получению неверных результатов исследования.

14. СВЕДЕНИЯ ОБ УТИЛИЗАЦИИ И ДЕЗИНФЕКЦИИ.

Согласно классификации по СанПиН 2.1.7.2790-10 компоненты набора могут быть отнесены к классу «Г». Утилизация использованных реагентов и реагентов с истекшим сроком годности производить в соответствии с СанПиН 2.1.7.2790-10 в отношении отходов класса «Г». Дезинфекцию следует проводить в соответствии с МУ 287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Рисунок 1.



По вопросам качества набора «Ферритин-Имаксиз (IMAXYZ)» обращаться в АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» по адресу: 194356, Россия, Санкт-Петербург, Дорога в Каменку, д. 56, лит. А, тел./факс (812)326-61-98

Генеральный директор

АО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»

Е.Н. Схолль-Энгбертс.

Генеральный директор

ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»

П.К.Варнавичус

Прошито, пронумеровано,
и скреплено печатью



ПРОШИТО
В КОЛИЧЕСТВЕ 73 ЛИСТОВ

« 07 АПР 2017 201__ год

Ген. Директор
ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР»
Варнавичус П.К.

