

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор

АО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

2022 г.



ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для иммуноферментного определения
концентрации ферритина в сыворотке (плазме) крови
(Ферритин – ИФА – БЕСТ)**

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов Ферритин – ИФА – БЕСТ предназначен для определения концентрации ферритина в сыворотке (плазме) крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Ферритин — глобулярный белковый комплекс, состоящий из 24 субъединиц и выполняющий роль основного внутриклеточного депо железа. Ферритин является основным показателем запасов железа в организме, играет важную роль в поддержании железа в биологически полезной форме. В его составе содержатся фосфаты железа. Ферритин синтезируется в клетках органов ретикуло-эндотелиальной системы, содержится во всех клетках и жидкостях организма. Наиболее богаты им предшественники эритроцитов в костном мозге, макрофаги и ретикулоэндотелиальные клетки печени; также обнаруживается в слизистой оболочке кишечника и в плазме.

1.3. Количественное определение содержания ферритина в клинической практике позволяет проводить дифференциальную диагностику заболеваний, сопровождающихся нарушениями метаболизма железа и анемиями, а также следить за развитием опухолей. Измерение сывороточного ферритина имеет клиническую значимость также при мониторинге железа в организме беременных женщин, доноров крови и пациентов, проходящих гемодиализ или лечение препаратами железа.

1.4. Набор рассчитан на проведение анализа в дублях 41 неизвестного, 6 калибровочных образцов и 1 пробы контрольного образца (всего 96 определений при ис-

Инструкция составлена сотрудниками АО «Вектор-Бест»: директором НИИ СД М.Ю. Рукавишниковым и начальником лаборатории иммунохимии С.С. Решетниковым.

пользовании всех стрипов планшета) или 27 неизвестных, 18 калибровочных и 3 проб контрольных образцов (при трех независимых постановках анализа).

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Метод определения основан на «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата моноклональных антител к ферритину с пероксидазой, во время инкубации одновременно происходит связывание ферритина с моноклональными антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок, и конъюгатом моноклональных антител с пероксидазой. Во время инкубации с раствором тетраметилбензидина происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски пропорциональна концентрации ферритина в анализируемых образцах. После измерения величины оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ферритина в анализируемых образцах.

2.2. Состав набора

В состав набора входят:

- планшет разборный (12 восьмилуночных стрипов) с иммобилизованными на внутренней поверхности моноклональными антителами к ферритину, готовый для использования – 1 шт.;
- калибровочный образец, содержащий 0 нг/мл ферритина – 1 флакон (9,0 мл);
- калибровочные образцы на основе сыворотки крови человека, аттестованные относительно стандарта «Lipocheck Tumor Marker Control» (фирма BioRad, Франция), содержащие известные количества ферритина – 20; 50; 100; 200; 500 нг/мл; концентрации ферритина в калибровочных образцах могут несколько отличаться от указанных величин, точные величины указаны на этикетках пробирок, готовые для использования – 5 пробирок (по 0,2 мл);
- контрольный образец на основе сыворотки крови человека с известным содержанием ферритина, готовый для использования – 1 пробирка (0,2 мл);
- конъюгат моноклональных антител к ферритину с пероксидазой хрена, концентрат – 1 флакон (1,4 мл);
- раствор для разведения конъюгата (РРК) – 1 флакон (13,0 мл);
- 25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином (ФСБ-Т×25) – 1 флакон (28,0 мл);
- субстратный буферный раствор (СБР) – 1 флакон (13,0 мл);
- тетраметилбензидин (ТМБ), концентрат – 1 флакон (1,0 мл);
- стоп-реагент (0,5 М серная кислота), готовый для использования – 1 флакон (12 мл).

Набор дополнительно комплектуется:

- пленкой для заклеивания планшета – 1 шт.;
- трафаретом для построения калибровочного графика – 1 шт.;
- ванночкой для реагентов – 2 шт.;
- наконечниками для пипеток на 4 – 200 мкл – 16 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Не обнаружено перекрестной реакции обоих моноклональных антител с сывороточным альбумином, гемоглобином, трансферрином, альфа-фетопротеином и хлоридом железа.

3.2. Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания ферритина в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора Ферритин – ИФА – БЕСТ не превышает 8%.

3.3. Линейность. Зависимость концентрации ферритина в образцах сыворотки крови имеет линейный характер в диапазоне концентраций 20–500 нг/мл. Отклонение от расчетной величины концентраций ферритина в образцах сыворотки крови не превышает 10%.

3.4. Точность. Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ферритина, предписанной в образце, полученной путем смешивания равных объемов контрольного образца и калибровочного образца 50 нг/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность. Минимальная достоверно определяемая набором концентрация ферритина не превышает 2,5 нг/мл.

3.6. Хук-эффект высоких концентраций.

При использовании набора Ферритин – ИФА – БЕСТ хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации ферритина 10 000 нг/мл.

3.7. Клиническая проверка. Содержание ферритина измеряли в сыворотке крови, взятой у 160 здоровых мужчин в возрасте 30–45 лет, у 110 здоровых женщин в возрасте 20–45 лет и у 105 женщин в возрасте 20–35 лет на разных сроках беременности. Средняя концентрация ферритина у мужчин составила 125 нг/мл, у женщин – 86 нг/мл. В первом триместре беременности средняя концентрация ферритина в сыворотке составила 70 нг/мл, во втором триместре – 38 нг/мл, в третьем – 16 нг/мл.

3.8. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентрации ферритина, соответствующие нормальным у здоровых людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ МЗ РФ от 06.06.2012 № 4н).

4.2. Все компоненты набора являются нетоксичными. Стоп-реагент обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть поражённый участок большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфекционные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или возбудителей других инфекций.

4.5. Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

4.6. Запрещается приём пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с наборами.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

– Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках стрипов при длине волны 450 нм и/или в двухволновом режиме при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм;

– шейкер термостатируемый орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при температуре 37 ± 1 °C и 400-800 об/мин;

– холодильник бытовой;

– пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 20, 50, 100 и 1000 мкл;

– пипетка полуавтоматическая многоканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объёмы жидкости 20, 50, 100 и 300 мкл;

– промывочное устройство для планшетов;

– флаконы стеклянные вместимостью 30 мл;

– цилиндр мерный вместимостью 100 мл;

– колбы вместимостью 1000 мл;

– вода дистиллированная;

- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная лабораторная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

6.1. Для проведения анализа не следует использовать гемолизованную, мутную сыворотку крови, а также сыворотку крови, содержащую азид натрия.

6.2. Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 5 сут или при температуре минус 20°C (и ниже) не более 3 мес.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

6.3. Образцы сывороток крови, содержащие осадок, необходимо очистить центрифугированием при 1000-1500 об/мин в течение 5 мин при температуре 18-25 °C.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты набора и исследуемые образцы сыворотки крови следует выдержать при температуре 18-25 °C в течение времени не менее 30 мин.

7.2. Подготовка планшета

Вскрыть пакет выше замка и установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы немедленно поместить вновь в пакет, удалить из него воздух и плотно закрыть замок; хранить при температуре 2-8 °C в течение всего срока годности.

7.3. Приготовление рабочего промывочного раствора

Внести в мерный цилиндр необходимое количество ФСБ-Т×25 и добавить соответствующее количество дистиллированной воды. При выпадении осадка солей в концентрате необходимо прогреть его при температуре 30-40 °C до полного растворения осадка.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Приготовленный рабочий промывочный раствор можно хранить при температуре 2-8 °C не более 5 сут.

7.4. Приготовление калибровочных образцов и контрольного образца

Калибровочные и контрольный образцы готовы к использованию.

Перед проведением анализа пробирки с калибровочными образцами и контрольным образцом встряхнуть или центрифугировать на микроцентрифуге так, чтобы капли растворов со стенок и крышки опустились на дно. Затем содержимое пробирок тщательно перемешать пипетированием, избегая вспенивания.

После отбора части содержимого тщательно укупоренные пробирки хранить при температуре 2-8 °С не более 1 мес.

7.5. Приготовление рабочего раствора конъюгата

Готовится в стеклянном флаконе из концентрата конъюгата и раствора для разведения конъюгата за 5-10 мин до начала анализа. Допускается хранение приготовленного раствора в течение 3 ч при температуре 18-25 °С.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

7.6. Приготовление рабочего раствора тетраметилбензидина

Готовится в стеклянном флаконе из концентрата тетраметилбензидина и субстратного буферного раствора за 5-10 мин до окончания инкубации. Допускается хранение приготовленного раствора в течение 3 ч при температуре 18-25 °С в защищенном от света месте.

В таблице приведен расход реагентов в зависимости от количества используемых стрипов.

Таблица

Кол-во используемых стрипов	Рабочий раствор конъюгата		Рабочий раствор тетраметилбензидина		Рабочий промывочный раствор	
	Конъюгат, концентрат, мл	Раствор для разведения конъюгата, мл	Концентрат тетраметилбензидина, мл	Субстратный буферный раствор, мл	25-кратный концентрат фосфатно-солевого буферного раствора с твином, мл	Вода дистиллированная, мл
2	0,2	1,8	0,1	2,0	4,0	96
4	0,4	3,6	0,2	4,0	8,0	192
6	0,6	5,4	0,3	6,0	12,0	288
8	0,8	7,2	0,4	8,0	16,0	384
10	1,0	9,0	0,5	10,0	20,0	480
12	1,2	10,8	0,6	12,0	24,0	576

7.7. Внести в соответствующие лунки в дублях по 20 мкл каждого калибровочного образца и по 20 мкл контрольного образца. В остальные лунки внести в дублях по 20 мкл анализируемых образцов сыворотки крови.

Внесение образцов необходимо производить быстро, в течение времени не более 10-15 мин.

7.8. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата.

Для внесения рабочего раствора конъюгата использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

7.9. Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин при встряхивании на шейкере при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 700 об/мин.

7.10. По окончании инкубации содержимое лунок удалить отсасыванием и промыть, добавляя во все лунки по 350 мкл рабочего промывочного раствора (см п. 7.3), с последующим отсасыванием. Процесс промывки повторить 5 раз. После промывки следует тщательно удалить остатки жидкости из лунок, постукивая планшетом в перевёрнутом положении по фильтровальной бумаге.

7.11. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора тетраметилбензидина (см п. 7.6) и инкубировать в темноте в течение 15 мин при температуре 18-25 °C.

Для внесения рабочего раствора тетраметилбензидина использовать ванночку для реагентов и одноразовые наконечники.

7.12. Внести во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и рабочий раствор тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента. Встряхнуть планшет на шейкере в течение 10-15 сек; при этом содержимое лунок окрашивается в жёлтый цвет.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

8.1. Измерить величину оптической плотности растворов в лунках стрипов на фотометре вертикального сканирования в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620 нм - 650 нм; или при длине волны 450 нм (выведение спектрофотометра на нулевой уровень («бланк»)) осуществлять по воздуху). Измерение проводить не позднее 10 мин после остановки реакции.

9. УЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1. Построить в линейных координатах калибровочный график зависимости оптической плотности (ед. опт. плотн.) от заданной концентрации ферритина в калибровочных образцах (нг/мл).

9.2. Определить содержание ферритина в контрольном образце и анализируемых пробах по калибровочному графику.

9.3. Если концентрация ферритина в анализируемых образцах сыворотки крови превышает 500 нг/мл, образец следует развести калибровочным образцом 0 нг/мл в 10 раз (10 мкл исследуемого образца + 90 мкл калибровочного образца 0 нг/мл), повторить анализ и полученный результат умножить на 10.

9.4. Построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации ферритина в контрольном образце.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов Ферритин-ИФА-БЕСТ должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2-8°C в течение всего срока годности (12 мес). Допускается хранение набора при температуре до 25 °C не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

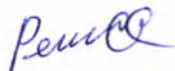
10.2. Для получения надёжных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

10.3. При постановке ИФА нельзя использовать компоненты из наборов разных серий или смешивать их при приготовлении растворов, кроме неспецифических компонентов (ФСБ-Т×25, СБР, ТМБ, стоп-реагент), которые взаимозаменяемы во всех наборах АО «Вектор-Бест».

По вопросам, касающимся качества набора Ферритин-ИФА-БЕСТ, следует обращаться в АО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121, тел. (383) 227-67-64, 336-60-60, тел./факс (383) 336-73-46, 336-60-30

Начальник лаборатории иммунохимии
НИИ СД «АО Вектор-Бест»



С.С. Решетников

Директор НИИ СД
АО «Вектор-Бест»



М.Ю. Рукавишников

Всего прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 2 листов.
Директор по технологии и качеству
АО "Вектор-Бест"



Масяго А.В.
2022 г.