

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Руководитель Департамента  
государственного контроля  
лекарственных средств и  
медицинской техники МЗ РФ

\_\_\_\_\_ В.Е. Акимочкин  
«24» декабря 2003 г.

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА  
РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
**ФЕРРИТИНА**  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

**(ИФА-ферритин)**

Рекомендована Комиссией по наборам реагентов  
для иммуноферментного (неинфекционные),  
радиоиммунологического и других видов  
иммунохимического анализа  
Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ  
(протокол № 8 от 22 сентября 2003 г.)

## **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

**1.1.** Набор реагентов ИФА-ферритин предназначен для количественного определения содержания ферритина в сыворотке крови человека методом твердофазного иммуноферментного анализа.

**1.2.** Ферритин является растворимым, легко мобилизуемым депо железа, необходимым для эффективного эритропоэза. В то же время он защищает организм от токсического действия железа, связанного с катализом продукции свободных радикалов. Молекула ферритина состоит из железосодержащего ядра и белковой оболочки (апоферритина) с молекулярной массой около 450000 Да, образованной 24 субъединицами — «тяжелыми» (H) и «легкими» (L). Каждая молекула способна удерживать до 4500 атомов железа в виде сложного комплекса гидроксидов и фосфатов.

Ферритин преимущественно находится в клетках селезенки, печени, красного костного мозга. В небольших количествах ферритин присутствует также в плазме крови. Его концентрация в большинстве случаев позволяет адекватно оценить общие запасы железа в организме.

Концентрация ферритина при рождении повышенная – до 600 нг/мл, за несколько месяцев она снижается примерно до 30 нг/мл, после чего начинает медленно возрастать и к 24–25 годам принимает значения, сохраняющиеся до старости. В норме для взрослых мужчин концентрация ферритина в сыворотке составляет 20–350 нг/мл, для женщин 10–150 нг/мл.

Концентрация ферритина ниже 10 нг/мл свидетельствует о наличии железодефицитной анемии. Этот показатель имеет важное значение для дифференцирования железодефицитной анемии от других типов анемий, патогенез которых не связан с железом, мониторинга запасов железа в организме беременных женщин, доноров крови, пациентов, регулярно подвергающихся процедуре гемодиализа. В случае перегрузки организма железом концентрация ферритина превышает 400–500 нг/мл, а при ярко выраженном гемохроматозе достигает нескольких тысяч нг/мл.

Концентрация ферритина в сыворотке крови возрастает при инфекционных, воспалительных процессах (остеомиелит, ревматоидный артрит), острых и хронических заболеваниях печени, лейкомии, болезни Ходжкина, раке молочной железы и некоторых других онкологических заболеваниях.

**1.3.** Набор ИФА-ферритин рассчитан на проведение анализа в дубликатах 40 неизвестных, 6 калибровочных проб, одной пробы контрольной сыворотки и одной пробы для определения оптической плотности раствора ТМБ при использовании всех стрипов одновременно.

**Примечание:** В случае дробного применения набор может быть использован в течение месяца после вскрытия компонентов набора.

## **2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА**

В наборе ИФА-ферритин использован «сэндвич»-вариант твердофазного иммуноферментного анализа. Для реализации этого варианта использованы два моноклональных антитела с различной эпитопной специфичностью к ферритину. Одно из них иммобилизовано на твердой фазе (внутренняя поверхность лунок), второе конъюгировано с пероксидазой хрена. В лунках, при добавлении исследуемого образца и конъюгата анти-ферритин-пероксидаза, во время инкубации одновременно происходит иммобилизация ферритина, содержащегося в исследуемом образце, и связывание его с конъюгатом. При удалении содержимого из лунок и промывке происходит удаление избытка конъюгата анти-ферритин-пероксидаза, не связавшегося с иммобилизованным в ходе инкубации ферритином. Количество связавшегося конъюгата прямо пропорционально количеству ферритина в исследуемом образце.

Во время инкубации с ТМБ происходит окрашивание раствора в лунках. Степень окраски прямо пропорциональна количеству ферритина в исследуемом образце. После измерения оптической плотности раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация ферритина в исследуемых образцах.

### **3. СОСТАВ НАБОРА:**

- Комплект из двенадцати восьмилуночных стрипов в рамке с иммобилизованными на внутренней поверхности лунок моноклональными антителами к ферритину, маркирован «Стрипы с моноклональными антителами к ферритину» — 1 пакет;
- калибровочные пробы на основе сыворотки крови, аттестованные по Второму международному стандарту ВОЗ IS 80/578, содержащие известные количества ферритина; концентрации ферритина в калибровочных пробах указаны на этикетках флаконов; калибровочная проба № 1 (0 нг/мл) — 1 флакон (3,0 мл) и калибровочные пробы №2–№6 — 5 флаконов (по 0,5мл);
- конъюгат анти-ферритин-пероксидаза, маркирован «Конъюгат Е» — 1 флакон (14 мл);
- концентрированный буферный раствор для промывки лунок, маркирован «БуферР» — 1 флакон (20 мл);
- раствор тетраметилбензидина, маркирован «Раствор ТМБ» — 1 флакон (14 мл);
- стоп-реагент, маркирован «Стоп-реагент» (1Н соляная кислота) — 1 флакон (14 мл);
- контрольная сыворотка с известным содержанием ферритина, маркирована «Контрольная сыворотка» — 1 флакон (0,5 мл).

### **4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА**

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

**4.2. Коэффициент вариации результатов определения ферритина в одном и том же образце сыворотки крови с использованием набора ИФА-ферритин не превышает 8%.**

**4.3. Линейность.** Зависимость концентрации ферритина в образцах сыворотки крови при разведении их сывороткой, не содержащей ферритина, имеет линейный характер в диапазоне концентраций калибровочных проб № 2 – № 6 и составляет  $\pm 10\%$ .

**4.4. Точность.** Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» ферритина — соответствие измеренной концентрации ферритина предписанной в пробе, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы № 3. Процент открытия составляет 90–110.

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

**4.6. Хук-эффект высоких концентраций.** В наборах реагентов, основанных на «сэндвич»-принципе анализа, при высоких концентрациях аналита зависимость величины оптической плотности от

концентрации становится обратно пропорциональной (так называемый хук-эффект высоких концентраций). При использовании набора ИФА-ферритин хук-эффект не обнаружен вплоть до концентрации ферритина 10 000 нг/мл.

**4.7.** Клиническая проверка. Содержание ферритина измеряли в сыворотке крови, взятой у 184 здоровых мужчин в возрасте 21–45 лет, у 140 здоровых женщин в возрасте 19–43 лет и у 52 женщин в возрасте 20–34 лет на разных сроках беременности. Средняя концентрация ферритина у мужчин составила 158 нг/мл (22–346 нг/мл), у женщин – 73 нг/мл (10–147 нг/мл). В первом триместре беременности средняя концентрация ферритина в сыворотке составила 61 нг/мл (55–90 нг/мл), во втором триместре – 32 нг/мл (25–74 нг/мл), в третьем – 12 нг/мл (10–16 нг/мл).

**4.8.** Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить значения концентраций ферритина, соответствующие нормальным.

## **5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

**5.1.** Потенциальный риск применения набора — класс 2а.

**5.2.** Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

**5.3.** 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.).

**5.4.** Стоп-реагент представляет собой 1N раствор соляной кислоты. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. В случае попадания раствора стоп-реагента на кожу и слизистые необходимо промыть пораженный участок большим количеством проточной воды.

**5.5.** При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. образцы и производные крови человека являются потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

**5.6.** Химическая посуда и оборудование, которые используются в работе с набором, должны быть соответствующим образом маркированы и храниться отдельно.

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

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

- Спектрофотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в стрипах при длине волны 450 нм;
- прибор для встряхивания рамки со стрипами (термостатируемый шейкер), позволяющий производить встряхивание со скоростью 500–800 об/мин при температуре +37°C;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками с изменяемым объемом отбора жидкостей: на 5–50 мкл; на 40–200 мкл; на 200–1000 мкл; на 1000–5000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая восьмиканальная со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости до 300 мкл;
- цилиндр мерный, позволяющий отмерять 200 мл;
- стакан стеклянный вместимостью 300 мл;
- вода дистиллированная;

- бумага фильтровальная;
- перчатки резиновые или пластиковые.

## **7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА**

**7.1.** Калибровочные пробы и контрольная сыворотка готовы к использованию.

**7.2.** Предварительное разведение исследуемых образцов сывороток крови. Если значения ферритина в исследуемых образцах по предварительным данным выше калибровочной пробы № 6, образцы следует развести калибровочной пробой № 1 (0 нг/мл) в 10 раз:

90 мкл калибровочной пробы № 1 + 10 мкл исследуемого образца.

При разведении необходимо тщательное перемешивание.

**7.3.** Стрипы. Перед вскрытием пакет со стрипами необходимо выдержать при комнатной температуре (+18...25°C) в течение времени не менее 30 минут. Открыть пакет и переставить на свободную рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся стрипы хранить в пакете с герметично закрытым замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.4.** Промывочныйбуфер. Необходимое количество Буфера Р развести дистиллированной водой в 10 раз.

Например: 5 мл Буфера Р + 45 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать, избегая пенообразования. Хранить закрытым при комнатной температуре не более 5 суток. Оставшийся неиспользованным Буфер Р хранить закрытым при температуре +2...8°C в течение всего срока годности.

**7.5.** Конъюгат анти-ферритин-пероксидаза готов к использованию.

**7.6.** Раствор ТМБ готов к использованию.

**7.7.** Стоп-реагент готов к использованию.

## **8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА**

**8.1.** Все реагенты перед проведением анализа должны быть тщательно перемешаны и доведены до комнатной температуры (+18...25°C). На последней странице приведена схема проведения анализа.

**8.2.** Составить протокол маркировки лунок. Лунки промаркировать следующим образом:

A1, A2 – № 1 для измерения величины оптической плотности раствора ТМБ;  
B1, B2 – № 2 для калибровочной пробы № 1;  
C1, C2 – № 3 для калибровочной пробы № 2;  
D1, D2 – № 4 для калибровочной пробы № 3;  
E1, E2 – № 5 для калибровочной пробы № 4;  
F1, F2 – № 6 для калибровочной пробы № 5;  
G1, G2 – № 7 для калибровочной пробы № 6;  
H1, H2 – № 8 для контрольной сыворотки.

**8.3.** Внести в соответствующие лунки по 20 мкл калибровочных проб и контрольной сыворотки, в оставшиеся лунки по 20 мкл исследуемой сыворотки крови в дубликатах.

**8.4.** Во все лунки, кроме лунок A1 и A2, внести по 100 мкл раствора конъюгата анти-ферритин-пероксидаза

**8.5.** Инкубировать стрипы в течение 30 минут при встряхивании в термостатируемом шейкере при температуре +37°C со скоростью 500–800 об/мин.

**8.6.** По окончании инкубации удалить содержимое лунок декантированием и промыть лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавить по 300 мкл промывочного буфера, приготовленного по п.7.4, встряхнуть рамку на шейкере в течение 5–10 секунд с последующим декантированием. После последнего декантирования тщательно удалить остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.

**8.7.** Немедленно внести во все лунки по 100 мкл раствора ТМБ. Инкубировать стрипы в темноте в течение 15–30 минут в зависимости от степени развития окраски.

**8.8.** Добавить во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор ТМБ, по 100 мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции, встряхивать на шейкере в течение 1–2 минуты.

**8.9.** Измерить на фотометре вертикального сканирования оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм. Если программа фотометра позволяет вычитать величину оптической плотности в лунках А1 и А2 из значений оптических плотностей всех остальных лунок, то для дальнейших расчетов необходимо использовать величину  $B$ — среднее арифметическое значение оптической плотности в лунках, содержащих калибровочные или исследуемые пробы. В линейных координатах построить калибровочный график зависимости  $B$  (ед.опт.плотн.) от концентрации ферритина в калибровочных пробах (нг/мл).

Если фотометр не позволяет вычитать величину оптической плотности лунок А1 и А2, то необходимо пользоваться формулой  $B - B_T$ , где  $B_T$  — среднее арифметическое значение оптической плотности лунок А1 и А2.

Определить содержание ферритина в пробах по калибровочному графику. В случае предварительного разведения образцов необходимо измеренную концентрацию ферритина умножить на фактор разведения.

**8.10.** Если по техническим причинам невозможно измерить оптическую плотность в лунках планшета непосредственно после выполнения п. 8.8, то следует иметь в виду, что окраска в лунках планшета стабильна в течение времени не более **20 минут** при температуре +2...8°C.

## **9. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА**

**9.1.** Набор ИФА-ферритин должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...8°C в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 5 суток.

Срок годности набора — 12 месяцев.

В случае дробного использования компоненты набора необходимо хранить следующим образом:

- стрипы хранить в герметично закрытом пакете с замком при температуре +2...8°C в течение всего срока годности;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- конъюгат Е и раствор ТМБ после вскрытия флаконов хранить не более 1 месяца при температуре +2...8°C;
- промывочный буфер, подготовленный к использованию, хранить закрытым не более 5 суток при комнатной температуре (+18...25°C);
- БуферР и стоп-реагент хранить при температуре +2.. 8°C в течение всего срока годности.

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

9.3. Пробы сыворотки крови можно хранить при температуре +2...8°C не более 2 дней; при необходимости более длительного хранения — при температуре –20°C и ниже. Избегать повторных циклов замораживания-размораживания.

9.4. При использовании набора для проведения нескольких независимых серий анализов необходимо иметь в виду, что для каждого независимого эксперимента необходимо построение нового калибровочного графика и рекомендуется определение концентрации ферритина в контрольной сыворотке.

9.5. Запрещается использовать стоп-реагенты из наборов реагентов других фирм-производителей.

9.6. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции.

**По вопросам качества набора ИФА-ферритин следует обращаться по адресу: г.Санкт-Петербург, пос. Песочный-2, ул.Ленинградская, д.70/4, тел/факс: (812) 596-67-80, или в ИГКЛС ФГУ «НЦ ЭСМП» МЗ РФ по адресу: 117246, Москва, Научный проезд, д.14А, тел. (095) 120-60-95.**

### СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Стадия анализа и реагенты	Номер пары лунок в соответствии с маркировкой по п. 8.2.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9–48
КП № 1, мкл	–	20	–	–	–	–	–	–	–
КП № 2, мкл	–	–	20	–	–	–	–	–	–
КП № 3, мкл	–	–	–	20	–	–	–	–	–
КП № 4, мкл	–	–	–	–	20	–	–	–	–
КП № 5, мкл	–	–	–	–	–	20	–	–	–
КП № 6, мкл	–	–	–	–	–	–	20	–	–
КС, мкл	–	–	–	–	–	–	–	20	–
С <sub>х</sub> , мкл	–	–	–	–	–	–	–	–	20
Конъюгат анти-ферритин-пероксидаза, мкл	–	100	100	100	100	100	100	100	100
Инкубация № 1	30 минут, термостатируемый шейкер, 37°C								
5-кратная промывка: промывочный буфер, мкл	5х	5х	5х	5х	5х	5х	5х	5х	5х
Раствор ТМБ, мкл	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Инкубация № 2	КТ, темное место, 15–30 минут								
Стоп-реагент, мкл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Перемешивание	Шейкер, 1–2 минуты								
Измерение ОП р-ров в лунках стрипов	Фотометр, 450 нм								
Расчет результатов	Калькулятор и масштабная бумага либо соответствующая компьютерная программа								

#### Примечания:

КП — калибровочная проба;

КС — контрольная сыворотка;

С<sub>х</sub> — анализируемые пробы;

ОП — оптическая плотность;

КТ — комнатная температура (+18...25°C)

Инструкция разработана:

В.А.Головаченко, зав.лабораторией ЗАО «АлкорБио»,

к.б.н. Д.Г.Полынцевым, ген. директором ЗАО «Алкор Био»;

к.м.н. Н.Н. Ткаченко, сотрудником НИИАГ им. Д.О. Отта РАМН.

