

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра
здравоохранения
Республики Беларусь

Б.Н. Андросюк
«12» 12 2020 г.



ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАСТВОРИМОГО РЕЦЕПТОРА ТРАНСФЕРРИНА

«Растворимый рецептор трансферрина-ИФА»

СОГЛАСОВАНО

Заместитель директора
РУП «Центр экспертиз
и испытаний в здравоохранении»

М.И. Злотникова
«13» 12 2020 г.



СОГЛАСОВАНО

Главный врач
УЗ «Минская областная
клиническая больница»

А.А. Линкевич
«07» 12 2020 г.



СОГЛАСОВАНО

Директор ГУ «Республиканский
научно-практический центр
трансфузиологии и медицинских
биотехнологий»

Ф.Н. Карпенко
«10» 02 2020 г.



СОГЛАСОВАНО

Директор ГУ «Республиканский
научно-практический центр радиационной
медицины и экологии человека»

А.В. Рожко
«18» 12 2020 г.



СОГЛАСОВАНО

Главный врач
УЗ «Минский клинический
консультативно-диагностический центр»

Н.М. Предко
«03» 12 2020 г.



РАЗРАБОТАНО

ГУ «Республиканский научно-
практический центр трансфузиологии
и медицинских биотехнологий»

1 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов для количественного определения растворимого рецептора трансферрина «Растворимый рецептор трансферрина-ИФА» (далее – набор реагентов) предназначен для количественного определения растворимого рецептора трансферрина (sTfR) в образцах сыворотки или плазмы методом иммуноферментного анализа.

Набор реагентов рассчитан на проведение анализа 40 неизвестных образцов, 7 калибровочных образцов и 1 контрольного образца в дублях при одновременном использовании всех лунок планшета.

Рецептор трансферрина (TfR) обеспечивает попадание связанного с железом трансферрина в клетки. Большое количество TfR расположено на поверхности вновь сформированных клеток, но эритроидные клетки костного мозга несут примерно 70-80 % всего пула TfR организма. Растворимый TfR (sTfR) является усеченной циркулирующей формой белка мембранного рецептора в результате протеолиза рецептора трансферрина в определенном сайте внеклеточного домена; это гликопротеин с молекулярным весом 95 кДа, образует в крови комплекс 320 кДа с трансферрином, связанным с двумя атомами железа.

Отщепленные мономеры sTfR можно определить в плазме или сыворотке. Отмечается устойчивая корреляция между общим количеством TfR и концентрацией sTfR в плазме или сыворотке и таким образом, концентрация sTfR в плазме или сыворотке является косвенным показателем содержания TfR. Плотность рецептора трансферрина на поверхности клеток-предшественников эритроцитов повышается по мере развития клеток вплоть до ретикулоцита, однако на поверхности зрелого эритроцита рецепторов трансферрина не обнаружено. Поскольку TfR экспрессируется главным образом на эритроидных клетках-предшественниках, предполагается, что уровень sTfR отражает скорость обновления эритроидных клеток, которая определяется скоростью пролиферации и потребностью в железе. Степень экспрессии TfR регулируется содержанием железа в клетке по типу обратной связи. Модуляция числа TfR происходит путем перераспределения молекул рецепторов трансферрина между наружной и внутренней поверхностями мембран клетки. В клинической практике изменение уровня sTfR в сыворотке связано с изменением скорости роста эритроидной ткани и/или запасов железа в организме. Например, при железодефицитной анемии (ЖДА) уровень циркулирующих sTfR будет повышен вследствие увеличения потребности в железе, необходимом для эритропоэза.

Результаты клинических исследований последних лет позволяют сделать вывод об уникальной диагностической ценности определения концентрации sTfR:

- при чрезмерном повышении ферритина (воспалительные процессы) истинную потребность железа можно определить только при определении концентрации sTfR;
- уровень sTfR соответствует «активной массе» эритропоэза;
- при дефиците железа уровень ферритина и растворимого рецептора трансферрина изменяются разнонаправленно: ферритин снижается, sTfR повышается;
- концентрация sTfR не реагирует на реакции острой фазы, острые нарушения функции печени или злокачественные новообразования, что позволяет проводить дифференциальную диагностику между анемией хронических заболеваний и ЖДА.

2 ХАРАКТЕРИСТИКИ И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

2.1 Состав набора реагентов:

В комплект поставки набора реагентов входят:

- планшет с иммобилизованными первыми антителами к sTfR (стрипованный (8×12)) – 1 шт.;
- вторые биотинилированные антитела к sTfR (200-кратный концентрат), 50 мкл – 1 микропробирка;
- конъюгат с пероксидазой хрена (200-кратный концентрат), 50 мкл – 1 микропробирка;

- стандарт sTfR для калибровки, 100 мкл – 3 микропробирки;
- контрольный образец, содержащий известное количество sTfR, 100 мкл – 3 микропробирки;
- буфер для инкубации Б1, 10 мл – 2 флакона;
- буфер для инкубации Б2, 12 мл – 2 флакона;
- буфер для отмывки (5-кратный концентрат), 100 мл – 1 флакон;
- субстратный буфер, 10 мл – 1 флакон;
- субстрат (ТМБ), 2,5 мл – 1 флакон;
- стоп-реагент (5 % серная кислота), 12 мл – 1 флакон;
- инструкция по применению.

Набор дополнительно комплектуется пленкой для заклеивания планшета.

2.2 Принцип метода

Метод определения основан на «сэндвич»-варианте твердофазного иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител к растворимому рецептору трансферрина человека.

На первой стадии анализа исследуемые и контрольные образцы инкубируют в лунках с иммобилизованными моноклональными антителами мыши (МКА). Имеющийся в образцах sTfR связывается с иммобилизованными на твердой фазе антителами. Связавшийся sTfR взаимодействует при инкубации со вторыми биотинилированными антителами. На второй стадии связавшийся комплекс взаимодействует при инкубации с стрептовидин пероксидазой хрена. Количество связавшегося конъюгата определяют цветной реакцией с использованием субстрата пероксидазы хрена – перекиси водорода и хромогена – тетраметилбензидина (ТМБ). Во время инкубации с раствором ТМБ происходит окрашивание в синий цвет раствора в лунках с пробами, содержащими растворимый рецептор. Степень окраски прямо пропорциональна концентрации sTfR в анализируемых образцах, калибровочных пробах и контрольном образце.

После измерения оптической плотности (ОП) раствора в лунках на основании калибровочного графика рассчитывается концентрация sTfR в анализируемых образцах. Калибровочный график строится на основании результатов анализа калибровочных проб, участвующих в анализе одновременно с исследуемыми образцами.

2.3 Аналитические и диагностические характеристики набора реагентов

Специфичность. Набор реагентов специфичен к нативному sTfR человека.

Воспроизводимость. Коэффициент вариации результатов определения содержания sTfR в одном и том же образце с использованием набора реагентов не превышает 10 %.

Чувствительность. Минимально определяемая концентрация sTfR, рассчитанная на основании среднего арифметического значения из десяти измерений оптической плотности «нулевого» калибровочного образца плюс 2σ (среднее квадратичное отклонение от среднего арифметического значения), не превышает 0,06 мкг/мл.

Диапазон измерений. Диапазон измеряемых концентраций 0-2 мкг/мл.

3 ТРЕБОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

3.1 Обеспечение безопасности персонала

Все компоненты набора реагента являются нетоксичными.

Персонал, использующий набор реагентов, должен быть обеспечен в установленном порядке средствами индивидуальной защиты и спецодеждой, должен соблюдать правила личной гигиены и асептики, принятые в медицинских учреждениях в отношении препаратов крови, в соответствии с действующим законодательством Республики Беларусь. Меры предосторожности при работе с кровью больных требуют соблюдения правил работы с условно патогенным материалом.

Персонал, использующий набор реагентов, должен соблюдать правила работы с химическими веществами. Стоп-реагент (5 % серная кислота) обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. **В случае попадания стоп-реагента (5 % серная кислота) на кожу и слизистые необходимо пораженный участок промыть большим количеством проточной воды.**

Утилизация брака и отходов от набора реагентов после его использования проводится в соответствии с требованиями санитарных норм и правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 7 февраля 2018 г № 14.

3.2 Обеспечение получения правильных результатов анализа

Достоверность и воспроизводимость результатов анализа зависят от выполнения следующих основных правил:

- для дезинфекции исследуемых образцов, посуды и материалов, контактирующих с исследуемыми и контрольными образцами, следует использовать дезинфицирующие средства, не оказывающие негативного воздействия на качество ИФА, например, комбинированные средства на основе четвертичных аммониевых соединений (ЧАС), спиртов, третичных аминов. Использование дезинфицирующих средств, содержащих активный кислород и хлор (перекись водорода, деохлор, хлорамин), в помещениях, где проводят ИФА, приводит к серьезному искажению результатов;

- не проводите ИФА в присутствии паров кислот, щелочей, альдегидов или пыли, которые могут сказаться на ферментативной активности антител и конъюгатов;

- не допускайте контактов каких-либо металлических предметов с конъюгатом и раствором ТМБ;

- избегайте загрязнения компонентов набора микроорганизмами и химическими примесями, для этого используйте в работе чистую посуду и чистые одноразовые наконечники для каждого реагента, контроля, образца;

- рабочие поверхности столов, оборудования следует обрабатывать 70 % раствором этилового спирта (не допускается использование перекиси водорода, хлорсодержащих растворов);

- не используйте одну и ту же емкость для конъюгата и раствора ТМБ;

- перед отбором ТМБ или субстратного буфера из флакона необходимо протереть конус пипетки (внутреннюю и внешнюю поверхности) сначала дистиллированной водой, а затем 70 % раствором этилового спирта, так как малейшее загрязнение пипеток конъюгатом может привести к контаминации всего содержимого флакона;

- если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов в лунку, то такая лунка бракуется.

Качество промывки лунок планшета играет важную роль для получения правильных результатов анализа:

- для аспирации анализируемых образцов и последующей промывки рекомендуется использовать автоматическое или ручное промывочное устройство;

- не допускайте высыхания лунок планшета в перерыве между завершением промывки и внесением реагентов;

- добивайтесь полного заполнения и опорожнения всех лунок планшета в процессе промывки, т.к. недостаточная аспирация жидкости из лунок может привести к понижению чувствительности и специфичности анализа;

- регулярно (не реже 1 раза в неделю) обрабатывайте промывочное устройство дезинфицирующим раствором. Для этого заполните промывочную систему (шланги, иглы промывателя) 70 % раствором этилового спирта, оставьте на ночь. Затем проведите 4-5 циклов отмытки системы дистиллированной водой;

- для предотвращения засорения игл промывочного устройства в конце рабочего дня обязательно выполните процедуру ополаскивания системы подачи жидкости дистиллированной водой.

4 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

Для работы с набором реагентов необходимо следующее дополнительное оборудование и материалы:

- спектрофотометр, позволяющий проводить измерения оптической плотности растворов в лунках планшета в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-655 нм; или при длине волны 450 нм;
- шейкер орбитального типа, позволяющий производить встряхивание при 450 об/мин;
- дозаторы полуавтоматические одноканальные и многоканальные с переменным или фиксированным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 1000 мкл;
- промыватель планшетов автоматический;
- флаконы стеклянные вместимостью 10-15 мл;
- цилиндр мерный 2-го класса точности вместимостью 100, 1000 мл;
- бумага фильтровальная лабораторная;
- перчатки резиновые хирургические;
- вода дистиллированная.

5 АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

На один анализ требуется 20 мкл сыворотки (плазмы) крови человека.

Требования к образцам.

Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную или хилезную сыворотку крови.

Образцы сыворотки (плазмы) крови можно хранить при температуре от 2 °С до 6 °С не более 24 часов при условии отсутствия микробной контаминации или при температуре минус 20 °С (и ниже) не более 3 мес. Повторное замораживание/размораживание проб запрещается. После размораживания образцы следует тщательно перемешать.

Образцы сывороток крови, содержащие взвешенные частицы, необходимо очистить центрифугированием при 7000 об/мин в течение 10 мин.

6 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Перед проведением анализа вскрыть упаковку набора реагентов, извлечь все компоненты, в том числе и запечатанный пакет с планшетом. Выдержать все компоненты набора реагентов и анализируемые образцы при температуре от 18 °С до 25 °С не менее 30 мин.

При дробном использовании набора реагентов после отбора части содержимого флаконы сразу плотно закрыть завинчивающимися крышками. Флаконы с реагентами поместить в холодильник и хранить при температуре от 2 °С до 6 °С в течение всего срока годности набора реагентов.

Буфер для инкубации Б1, буфер для инкубации Б2, контрольный образец с известной концентрацией растворимого рецептора трансферрина, субстратный буфер, субстрат (ТМБ) и стоп-реагент (5 % серная кислота) готовы к использованию и не требуют дополнительного разведения.

6.1 Подготовка планшета

Вскрыть пакет и достать планшет. Установить на рамку необходимое для проведения анализа количество стрипов. Использовать стрипы в течение 1 часа после извлечения. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно поместить вновь в пакет и плотно закрыть.

Хранение: при температуре 2-6 °С в течение всего срока годности.

6.2 Приготовление промывочного раствора

Промывочный раствор приготовить разведением исходного буфера для отмывки (5-кратный концентрат) в 5 раз. Для этого в соответствии с числом используемых лунок (см. таблицу расхода компонентов) внести в мерный цилиндр необходимое количество буфера для отмывки (5-кратный концентрат) и довести до соответствующего объема дистиллированной водой.

При выпадении осадка солей в буфере для отмывки (5-кратный концентрат) необходимо прогреть его при температуре 30-40 °С до полного растворения осадка.

Хранение: неиспользованный разведенный промывочный раствор хранению не подлежит.

6.3 Подготовка буфера для инкубации Б1

Буфер для инкубации Б1 готов к использованию. В соответствии с числом используемых лунок (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество буфера для инкубации Б1.

Хранение: при температуре 2-6 °С в течение всего срока годности.

6.4 Подготовка буфера для инкубации Б2

Буфер для инкубации Б2 готов к использованию. В соответствии с числом используемых лунок (см. таблицу расхода компонентов) отобрать в чистый флакон или в пластиковую ванночку для реагента необходимое количество буфера для инкубации Б2.

Хранение: при температуре 2-6 °С в течение всего срока годности.

6.5 Подготовка калибровочных образцов

Из пробирки со стандартом для калибровки с концентрацией 50 мкг/мл приготовить разведения калибровочных образцов до конечных концентраций – 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 и 0,06 мкг/мл в буфере для инкубации Б1.

Хранение: неиспользованный разведенный стандарт для калибровки sTfR хранению не подлежит.

6.6 Подготовка вторых биотинилированных антител к sTfR (200-кратный концентрат)

В соответствии с числом используемых лунок (см. таблицу расхода компонентов) развести необходимое количество вторых биотинилированных антител к sTfR буфером для инкубации Б2 в соотношении 1:200.

Остатки антител из флакона или ванночки утилизировать **(не сливать во флакон с исходными антителами)**.

Хранение: неиспользованные разведенные антитела хранению не подлежат.

6.7 Подготовка конъюгата с пероксидазой хрена (200-кратный концентрат)

В соответствии с числом используемых лунок (см. таблицу расхода компонентов) развести в чистом флаконе или в пластиковой ванночке для реагента необходимое количество конъюгата с пероксидазой хрена буфером для инкубации Б2 в соотношении 1:200.

Остатки конъюгата из флакона или ванночки утилизировать **(не сливать во флакон с исходным конъюгатом)**.

Хранение: неиспользованный разведенный конъюгат хранению не подлежит

6.8 Подготовка субстрат-индикаторного раствора

Субстратный буфер и субстрат (ТМБ) готовы к использованию. Исключить воздействие прямого света на данные растворы. Непосредственно перед внесением и в соответствии с числом используемых лунок (см. таблицу расхода компонентов) смешать необходимые количества субстрата (ТМБ) и субстратного буфера в соотношении 1:4 в чистом флаконе или в пластиковой ванночке для реагента.

Утилизировать оставшийся раствор после проведения ИФА **(не сливать во флаконы с исходными растворами)**.

Внимание! Для работы с субстратным буфером и субстратом (ТМБ) необходимо использовать только одноразовые наконечники. Посуду, предназначенную для данных растворов, нельзя отмывать с применением синтетических моющих средств, поскольку даже их следы ведут к неконтролируемому окислению ТМБ в ходе реакции. После работы посуду ополоснуть водой, промыть 70 % раствором этилового спирта и тщательно отмыть дистиллированной водой.

Таблица расхода компонентов набора реагентов

Кол-во используемых рядов лунок	Буфер для инкубации Б1, мл	Буфер для инкубации Б2, мл (на одну инкубацию)	Субстрат (ТМБ), мл	Субстратный буфер, мл	Промывочный раствор	
					Буфер для отмывки (5-кратный концентрат), мл	Дистиллированная вода, мл
2	2,0	2,0	0,4	1,6	6	до 30
3	3,0	3,0	0,6	2,4	9	до 45
4	4,0	4,0	0,8	3,2	12	до 60
5	5,0	5,0	1,0	4,0	15	до 75
6	6,0	6,0	1,2	4,8	18	до 90
7	7,0	7,0	1,4	5,6	21	до 105
8	8,0	8,0	1,6	6,4	24	до 120
9	9,0	9,0	1,8	7,2	27	до 135
10	10,0	10,0	2,0	8,0	30	до 150
11	11,0	11,0	2,2	8,8	33	до 165
12	12,0	12,0	2,4	9,6	36	до 180

7 ПРОВЕДЕНИЕ ИФА

7.1 Внесение буфера для инкубации Б1 и образцов. Инкубация

Внимание! *Время внесения образцов не должно превышать 10 мин при использовании всех лунок планшета.*

Внести во все лунки по 100 мкл буфера для инкубации Б1.

Внести в дублях, начиная с верхних левых лунок, по 20 мкл калибровочных образцов: 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 мкг/мл.

Внести в дублях по 20 мкл буфера для инкубации Б1 («нулевая» проба, 0 мкг/мл).

Внести в дублях по 20 мкл контрольного образца, содержащего известное количество sTfR.

В остальные лунки внести в дублях по 20 мкл анализируемых образцов сыворотки или плазмы крови.

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 60 мин на шейкере при температуре 20-25 °С с интенсивностью перемешивания 450 об/мин.

7.2 Промывка

По окончании инкубации с помощью промывочного устройства или вручную промыть лунки планшета 3 раза промывочным раствором, чередуя аспирацию и немедленное заполнение лунок каждого ряда.

В каждую лунку вносить не менее 200 мкл жидкости в процессе каждого цикла промывки. Время между заполнением и опорожнением лунок должно быть не менее 60 с.

Необходимо добиваться полного опорожнения лунок после каждого их заполнения.

По окончании промывки остатки влаги из лунок тщательно удалить, постукивая перевернутым планшетом по фильтровальной бумаге.

7.3 Внесение вторых биотинилированных антител к sTfR. Инкубация

Внести во все лунки по 100 мкл рабочего разведения вторых биотинилированных антител к sTfR (п. 6.6).

Для внесения вторых биотинилированных антител к sTfR использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники. Остатки антител утилизировать (не сливать во флакон с исходными антителами).

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 40 мин на шейкере при температуре 20-25 °С с интенсивностью перемешивания 450 об/мин.

7.4 Промывка

По окончании времени инкубации промыть планшет 3 раза как описано выше.

7.5 Внесение конъюгата с пероксидазой хрена. Инкубация

Внести во все лунки по 100 мкл рабочего разведения конъюгата с пероксидазой хрена (п. 6.7).

Для внесения конъюгата с пероксидазой хрена использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники. Остатки конъюгата утилизировать (не сливать во флакон с исходным конъюгатом!).

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в течение 30 мин на шейкере при температуре 20-25 °С с интенсивностью перемешивания 450 об/мин.

7.6 Промывка

По окончании времени инкубации промыть планшет 3 раза как описано выше.

7.7 Внесение субстрат-индикаторного раствора. Инкубация

Приготовить субстрат-индикаторный раствор путем смешивания субстратного буфера с субстратом (ТМБ) в соотношении 4:1. Внести во все лунки по 100 мкл данного раствора (п. 6.8).

Для внесения раствора использовать пластиковую ванночку и одноразовые наконечники. Остатки субстратного буфера и субстрата (ТМБ) утилизировать (не сливать во флакон с исходными растворами!).

Планшет заклеить пленкой и инкубировать в защищенном от света месте при температуре 20-25 °С в течение 10-15 мин под периодическим визуальным контролем.

7.8 Внесение стоп-реагента (5 % серная кислота)

Внести во все лунки по 100 мкл стоп-реагента (5 % серная кислота).

7.9 Проведение измерений

Через 2-3 мин после остановки реакции измерить оптическую плотность с помощью спектрофотометра в двухволновом режиме: при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения в диапазоне 620-655 нм; или при длине волны 450 нм. Время между остановкой реакции и измерением оптической плотности не должно превышать 10 мин.

8 РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

По результатам измерений вычислить средние арифметические значения оптических плотностей в лунках с анализируемыми образцами.

Построить калибровочный график зависимости оптической плотности (ось ординат) от концентрации sTfR (ось абсцисс) в калибровочных образцах. Для этого можно использовать Microsoft Excel или его аналоги (OpenOffice Calc и др.).

Если концентрация sTfR в анализируемом образце превышает 2 мкг/мл, образец следует дополнительно развести буфером для инкубации Б1 в 10 раз (10 мкл исследуемого образца + 90 мкл буфера для инкубации Б1), повторить анализ и полученный результат умножить на 10.

9 УСЛОВИЯ ПРАВИЛЬНОСТИ РАБОТЫ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Результаты анализа исследуемых образцов учитывать, если будут выполнены следующие условия:

- соотношение оптических плотностей (ОП) калибровочных образцов: $ОП_0 < ОП_{0,06} < ОП_{0,125} < ОП_{0,25} < ОП_{0,5} < ОП_1 < ОП_2$;
- $ОП_2 \geq 1,0$ единицы оптической плотности (о.е.);
- $ОП_0 < 0,2$ о.е.;
- вычисленное по калибровочному графику значение концентрации sTfR в контрольном образце попадает в пределы, указанные на этикетке пробирки.

$ОП_0$, $ОП_{0,06}$, $ОП_{0,125}$, $ОП_{0,25}$, $ОП_{0,5}$, $ОП_1$, $ОП_2$ – среднее значение оптической плотности калибровочных образцов 0; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1 и 2 мкг/мл соответственно.

10 ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Растворимый рецептор трансферрина (sTfR) был введен в качестве многообещающего нового диагностического инструмента для различения железодефицитной анемии (ЖДА) и анемии хронического заболевания (АХЗ). Концентрация циркулирующего sTfR пропорциональна клеточной экспрессии мембраносвязанного TfR и увеличивается с ростом потребностей клетки в железе, а также во время клеточной пролиферации. Кроме того, поскольку ферритин в сыворотке отражает запасы железа в депо, а sTfR отражает запасы функционального железа, был предложен индекс sTfR/log ферритина (индекс sTfR-logF) в качестве более значимого показателя содержания железа в организме по сравнению с отношением sTfR/ферритин (sTfR/F). Различие между ЖДА и АХЗ является ключевым моментом для определения, будет ли полезно лечение препаратами железа. sTfR помогает определить дефицит железа; параметр полезен для мониторинга эритропоэза при опухолевых заболеваниях и хронической почечной недостаточности. Развитие эритропоэза после трансплантации костного мозга или стволовых клеток определяется общей пролиферативной способностью костного мозга, который можно контролировать по sTfR. Во время апластического периода до трансплантации костного мозга уровни sTfR снижаются. После того, как эритропоэз восстанавливается, уровни sTfR возвращаются к нормальным значениям. При анемиях, ассоциированных с повышенным эритропоэзом и дефицитом железа, наблюдается повышение значений sTfR. Дефицит железа может приводить к 20-кратному повышению уровня sTfR. Возрастание уровня этого белка может быть вызвано также гемолитической анемией, первичной и вторичной полицитемией и талассемией, тогда как анемия хронического заболевания почек и апластическая анемия могут приводить к снижению концентрации sTfR. Наиболее важным клиническим применением определения sTfR является дифференциальная диагностика ЖДА и АХЗ. При анемии хронической почечной недостаточности ранний рост уровня sTfR после начала терапии рекомбинантным человеческим эритропоэтином полезен для прогноза и оценки гематологического ответа на терапию. Изменение уровня sTfR происходит до любых изменений значений гематокрита или Hb, которые можно обнаружить, что позволяет рано менять дозировку эритропоэтина и препаратов железа при лечении. У sTfR и отношения sTfR/F есть еще одно полезное приложение. Недавнее исследование показало, что отношение sTfR/F помогает различать пациентов с анемией с целиакией и без целиакии. Субклинический дефицит железа на ранних сроках беременности в значительной степени связан с бактериальным вагинозом, и отсюда sTfR и индекс sTfR/logF также могут играть определенную роль в оценке риска в этих условиях. Также было показано, что индекс sTfR/logF превосходит рутинные тесты в прогнозе ответа на лечение препаратами железа у пациентов, длительно находящихся на гемодиализе, и в дискриминации больных с дефицитом железа и различными гемоглобинопатиями. sTfR также отражает скорость пролиферации эритроидных клеток и потребности в железе, но, так как sTfR не является острофазовым реактантом, он не подвержен влиянию воспалительного процесса. Таким образом, sTfR – полезное дополнение к существующей диагностике анемий.

При динамическом наблюдении пациента для получения результатов, адекватно отражающих изменение концентрации sTfR в крови, необходимо использовать наборы реагентов одного наименования (одного предприятия-изготовителя).

Контроль состояния пациента в динамике нужно проводить всегда с одинаковым материалом.

11 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ

Набор реагентов следует хранить в сухом, защищенном от света месте при температуре $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ в течение всего срока годности.

Условия транспортирования набора реагентов должны соответствовать условиям его хранения.

Набор реагентов транспортируют всеми видами транспорта в крытых транспортных средствах в соответствии с правилами перевозки грузов, действующими на каждом виде транспорта.

По окончании срока годности набор реагентов не использовать!

Дробное использование набора реагентов может быть реализовано в пределах всего срока годности набора реагентов.

В случае дробного использования набора реагентов построение калибровочного графика необходимо проводить для каждого независимого эксперимента, а также рекомендуется определение концентрации sTfR в контрольном образце.

Нельзя использовать реагенты из наборов других фирм-изготовителей.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение настоящей инструкции по применению набора реагентов.

12 ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

Изготовитель гарантирует соответствие набора реагентов требованиям настоящих технических условий при соблюдении условий транспортирования и хранения. Безопасность и качество набора реагентов гарантируются в течение всего срока годности.

Изготовитель отвечает за недостатки изделия, за исключением дефектов, возникших вследствие нарушения правил пользования, условий транспортирования и хранения, либо действия третьих лиц, либо непреодолимой силы.

Изготовитель обязуется за свой счет заменить изделие, технические и функциональные характеристики (потребительские свойства) которого не соответствуют нормативной и технической документации, если указанные недостатки явились следствием скрытого дефекта материалов или некачественного изготовления изделия производителем.

13 ЮРИДИЧЕСКИЙ АДРЕС ИЗГОТОВИТЕЛЯ

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» (РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий)

220053, Республика Беларусь, г. Минск, Долгиновский тракт, 160

УНП 190572781, ОКПО 37652513

Тел. (8-017) 289-01-06; факс: (8-017) 289-87-45;

e-mail: rnpc@blood.by; <http://blood.by/>

**Краткая схема проведения ИФА с помощью
Набора реагентов для количественного определения растворимого рецептора
трансферрина «Растворимый рецептор трансферрина-ИФА»**

Использовать только после внимательного ознакомления с инструкцией!

- Внести:** по 100 мкл буфера для инкубации Б1.
Внести: по 20 мкл калибровочных образцов в дублях;
по 20 мкл буфера для инкубации Б1 в дубле («нулевая» проба);
по 20 мкл контрольного образца, содержащего известное количество sTfR, в дубле;
по 20 мкл анализируемых образцов в дублях.
Инкубировать: 60 мин, 20-25 °С, 450 об/мин.
Промыть: промывочным раствором, 200 мкл, 3 раза.
Внести: по 100 мкл рабочего разведения вторых биотинилированных антител к sTfR.
Инкубировать: 40 мин, 20-25 °С, 450 об/мин.
Промыть: промывочным раствором, 200 мкл, 3 раза.
Внести: по 100 мкл рабочего разведения конъюгата с пероксидазой хрена.
Инкубировать: 30 мин, 20-25 °С, 450 об/мин.
Промыть: промывочным раствором, 200 мкл, 3 раза.
Внести: по 100 мкл субстрат-индикаторного раствора.
Инкубировать: 10 мин, 20-25 °С, в темноте при визуальном контроле (15-20 мин).
Внести: по 100 мкл стоп-реагента (5 % серная кислота).
Измерить: ОП при 450 нм / референсная длина волны в диапазоне 620-655 нм.