

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Ferritin ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Ferritin in human serum and plasma



DE4408



96 wells

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE	3
2	PRINCIPLE	3
3	REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION	4
4	WARNINGS	4
5	PRECAUTIONS	5
6	PROCEDURE	6
7	QUALITY CONTROL	7
8	RESULTS	7
9	REFERENCE VALUES	7
10	PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS	8
11	WASTE MANAGEMENT	8
12	BIBLIOGRAPHY	8
13	TROUBLESHOOTING	9
1	VERWENDUNGSZWECK	10
2	TESTPRINZIP	10
3	REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG	10
4	WARNHINWEISE	11
5	VORSICHTSMASSNAHMEN	11
6	TESTDURCHFÜHRUNG	12
7	QUALITÄTSKONTROLLE	13
8	ERGEBNISSE	13
9	REFERENZWERTE	13
10	TESTCHARAKTERISTIKA	13
11	ENTSORGUNG	13
12	LITERATUR	13
13	FEHLERBEHEBUNG (TROUBLESHOOTING)	14
1	DESTINAZIONE D'USO	15
2	PRINCIPIO DEL METODO	15
3	REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE	15
4	AVVERTENZE	16
5	PRECAUZIONI	17
6	PROCEDIMENTO	17
7	CONTROLLO QUALITA'	18
8	RISULTATI	18
9	VALORI DI RIFERIMENTO	19
10	PARAMETRI CARATTERISTICI	19
11	DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO	20
12	BIBLIOGRAFIA	20
13	SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING	20
1	USO PREVISTO	21
2	PRINCIPIO DEL MÉTODO	21
3	REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS	22
4	ADVERTENCIAS	23
5	PRECAUCIONES	24
6	PROCEDIMIENTO	24
7	CONTROL DE CALIDAD	25
8	RESULTADOS	25
9	VALORES DE REFERENCIA	26
10	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	26
11	INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN	26
12	BIBLIOGRAFÍA	27
13	SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS	27
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS		28

Demeditec Diagnostics GmbH • Lise-Meitner-Straße 2 • 24145 Kiel (Germany)

1 INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Ferritin concentration in human serum or plasma. Ferritin ELISA is intended for laboratory use only.

1.1 Clinical Significance

Ferritin is a globular protein found mainly in the liver, which can store about 2'250 iron (Fe^{3+}) ions. The ferritin molecule consists of a protein shell (apoferritin) composed of heavy and light subunits, which surrounds a crystalline core containing iron oxide and phosphate. Ferritin is synthesized in the liver, spleen and numerous other body tissues, with major concentrations found in the liver, spleen, bone marrow, and intestinal mucosa. The ferritin levels measured have a direct correlation with the total amount of iron stored in the body. If ferritin is high there is iron in excess, which would be excreted in the stool. If ferritin is low there is a risk for lack in iron, which sooner or later could lead to anaemia. In the setting of anaemia, serum ferritin is the most sensitive lab test for iron deficiency anaemia. In contrast, serum ferritin levels are normal or increased in anemia associated with chronic disease. Elevated serum ferritin levels have been observed in acute and chronic liver disease and lymphoid malignancy (leukemia and Hodgkin lymphoma). High serum ferritin levels have also been associated with an elevated risk for myocardial infarction in men. Ferritin is also used as a marker for iron overload disorders, such as haemochromatosis in which the ferritin level may be abnormally raised. Ferritin is an acute-phase reactant, it is often elevated in the course of disease. Free iron is toxic to cells, and the body has an elaborate set of protective mechanisms to bind iron in various tissue compartments. Within cells, iron is stored complexed to protein as ferritin or hemosiderin. Apoferritin binds to free ferrous iron and stores it in the ferric state. Under steady state conditions, the serum ferritin level correlates with total body iron stores; thus, the serum ferritin level is the most convenient laboratory test to estimate iron stores.

2 PRINCIPLE

The Ferritin ELISA is based on simultaneous binding of human Ferritin to two monoclonal antibodies, one immobilized on the microwell plate and the other conjugated with horseradish peroxidase (HRP). After incubation the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing. Then the enzyme conjugated with HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added. The colour intensity is proportional to the Ferritin concentration in the sample. The Ferritin concentration in the sample is calculated based on a standard curve.

3 REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION

3.1 Reagents and materials supplied in the kit

- CAL 0** Zero Standard (1 vial) 3 mL and
CAL 1 – 5 Standard (Standard 1 - 5), 5x (1 vial = 1 mL)
- CONTROL** Ferritin Control (1 vial) 1 mL
Control concentration is indicated on the Certificate of Analysis
- ENZ CONJ** Enzyme Conjugate (1 bottle) 12 mL
Anti-Ferritin antibody conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)
- SORB MT** Microtiterwells (1 microplate breakable)
Antibody anti-Ferritin adsorbed on microplate
- SUB TMB** Substrate Solution (1 bottle) 15 mL
H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)
- STOP SOLN** Stop Solution (1 bottle) 15 mL
Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)
- WASH SOLN 10x** Wash Solution 10X (1 vial) 50 mL
Phosphate buffer 0.2 M, pH 7.4

3.2 Reagents necessary not supplied

- Distilled water.

3.3 Auxiliary materials and instrumentation

- Automatic dispenser.
- Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents between 2 °C - 8 °C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use, once opened, it is stable until the expiry date of the kit.

Do not remove the adhesive sheets on the strips unutilised.

4 WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HBsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, Calibrators and Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300 as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Ferritin from 5 to 1000 ng/mL.

5 PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2 °C - 8 °C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22 °C - 28 °C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6 PROCEDURE

6.1 Preparation of the Standards (S₀, S₁, S₂, S₃, S₄, S₅)

The standards are ready to use and are calibrated against the WHO 1st IS Ferritin 80/602 and have the following concentrations:

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
ng/mL	0	5	20	100	400	1000

For sample with concentration greater than 1000 ng/mL dilute the sample with Zero Standard S₀. Once open, the standards are stable 6 months at 2 °C - 8 °C

6.2 Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the wash solution concentrate (10X) with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2 °C - 8 °C. In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care to transfer completely the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

6.3 Preparation of the Sample

Ferritin determination should be done in human serum or plasma. Specimen can be stored at 2 °C - 8 °C for a short time (max five days). For longer storage the specimen should be frozen at -20 °C. Avoid repeated freezing and thawing. The Control is ready to use.

6.4 Procedure

- Allow all reagents to reach room temperature (22 °C - 28 °C) **for at least 30 minutes**. At the end of the assay, store immediately the reagents at 2 °C - 8 °C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 °C - 8 °C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (S₀-S₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Standard	Sample/ Control	Blank
Sample/Control		20 µL	
Standard S ₀ -S ₅	20 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate for 1 hour at room temperature (22 °C - 28 °C). Remove the content from each well. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 10 minutes at room temperature (22 °C - 28 °C) in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7 QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Ferritin for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the standard curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8 RESULTS

Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbencies (E_m) corresponding to the single points to the standard curve (S0-S5) and of each sample.

Standard Curve

Plot the values of absorbance of the standards against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (e.g.: Cubic Spline or Four Parameter Logistic).

Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the standard curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in ng/mL.

9 REFERENCE VALUES

The serum values are comprised in the following intervals:

		Mean (ng/mL)	Range (ng/mL)
Women	Premenopausal	53	6 - 180
	Post-menopausal	105	8 - 350
Men		175	20 - 400

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10 PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1 Precision

10.1.1 Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate measurement (15x) of three different control sera in one assay. The within assay variability is $\leq 7.5\%$.

10.1.2 Inter Assay Variation

Between run variations was determined by replicate measurement (16x) of three different control sera in different lots. The between assay variability is $\leq 6.1\%$.

10.2 Specificity

The cross reaction of the antibody calculated on a weight/weight basis are shown in the table:

Liver Human Iso-Ferritin	100 %
Spleen Human Iso-Ferritin	80 %
Hearth Human Iso-Ferritin	12 %

10.3 Accuracy

The recovery of 12.5 – 25 – 50 – 100 – 200 ng/mL of Ferritin added to sample gave an average value (\pm SD) of 98.66% \pm 2.90%.

The dilution test performed on 3 samples diluted up to 8 times gave an average value (\pm SD) of 102.11% \pm 5.32%.

10.4 Sensitivity

The lowest detectable concentration of Ferritin that can be distinguished from the zero standard is 0.04 ng/mL at the 95 % confidence limit.

10.5 Correlation with RIA

The Ferritin ELISA DE4408 was compared to another commercially available Ferritin assay.

Serum samples of 22 females and 32 males were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated (DE4408) = 1.11 * (Ferritin Diasorin) - 10.46
 $r^2 = 0.972$

10.6 Hook Effect

The Ferritin ELISA, a competitive enzyme immunoassay, shows no Hook Effect up to 50,000 ng/mL

11 WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

12 BIBLIOGRAPHY

Walter G.O., et al J. Clin. Path., 29 770 - 772 (1973)

Watanabe, N. et al Clin. Chem., 25/1, 80 – 82 (1979)

Van Oost, S.A. et al Clin. Chem. , 28/12 ,2429 – 2433 (1982)

Ronald H, et al Clin. Chem., 29/6, 1109 - 1113 (1983)

13 TROUBLESHOOTING

ERRORS / POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Too high within-run CV%

- reagents and/or strips not pre-warmed to room temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)

Too high between-run CV %

- incubation conditions not constant (time, temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

1 VERWENDUNGSZWECK

Immunozytometrisches kolorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Ferritin-Konzentration humanem Serum und Plasma. Der Ferritin ELISA ist nur für den Laborgebrauch.

2 TESTPRINZIP

Der Ferritin ELISA basiert auf der gleichzeitigen Bindung von humanem Ferritin an zwei monoklonale Antikörper, von denen der eine auf der Mikrotiterplatte fixiert und der andere mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist. Nach der Inkubation werden gebundenes und freies Antigen durch einfach durchzuführendes Waschen der festen Phase getrennt. Dann reagiert das mit HRP konjugierte Enzym in der gebundenen Fraktion mit dem Substrat (H_2O_2) und dem TMB-Substrat und entwickelt eine blaue Färbung, die sich nach gelb verändert, wenn die Stopplösung (H_2SO_4) hinzugefügt wird. Die Intensität der Färbung ist proportional zur Ferritinkonzentration in der Probe. Die Ferritinkonzentration in der Probe wird mit einer Standardkurve berechnet.

3 REAGENZIEN, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG

3.1 Im Kit enthaltene Reagenzien und Materialien

- CAL 0** Ferritin **Zero Standard (Nullstandard)** (1 Fläschchen) 3 mL und **CAL 1 – 5** Ferritin **Standard (Standard 1 - 5)**, 5x (1 Fläschchen = 1 mL)
- CONTROL** Ferritin **Control (Kontrolle)** (1 Fläschchen) 1 mL
Die Konzentration der Kontrolle ist auf dem Analysenzertifikat angegeben.
- ENZ CONJ** **Enzyme Conjugate (Enzymkonjugat)** (1 Flasche) 12 mL
Anti-Ferritin-Antikörper konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)
- SORB MT** **Microtiterwells** (1 Mikrotiterplatte zum Auseinanderbrechen)
Anti-Ferritin-Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden
- SUB TMB** **Substrate Solution (Substratlösung)** (1 Flasche) 15 mL
 H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (Hautkontakt vermeiden)
- STOP SOLN** **Stop Solution (Stopplösung)** (1 Flasche) 15 mL
Schwefelsäure 0,15 mol/L (Hautkontakt vermeiden)
- WASH SOLN 10x** **Wash Solution 10X (Waschlösung)** 10-fach konzentriert (1 Flasche) 50 mL
Phosphatpuffer 0,2 M, pH 7,4

3.2 Nicht im Kit enthaltene erforderliche Reagenzien

- Destilliertes Wasser.

3.3 Erforderliche Hilfsmittel und Geräteausstattung

- Pipettierautomat
- Mikrotiterplatten-Lesegerät (450 nm, 620-630 nm)

Wichtige Hinweise

Alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C im Dunkeln lagern.

Den Beutel mit Reagenz 4 (Coated Microplate / Beschichtete Mikrotiterplatte) erst öffnen, wenn er Raumtemperatur angenommen hat und sofort nach Gebrauch wieder verschließen; geöffnet ist die Mikrotiterplatte bis zum Ablauf des Verfalldatums des Kits haltbar.

Klebestreifen auf unbenutzten Streifen nicht entfernen.

4 WARNHINWEISE

- Dieses Testkit ist nur für In-vitro-Diagnostik zur Anwendung durch Fachpersonal bestimmt. Nicht zur inneren oder äußeren Anwendung bei Mensch oder Tier geeignet.
- Beim Arbeiten mit den enthaltenen Reagenzien geeignete persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- Beim Arbeiten mit Blutprodukten die GLP- („Good laboratory practice“) Richtlinien befolgen.
- Die humanen Ausgangsmaterialien für die Produktion der Reagenzien dieses Produkts wurden auf Antikörper gegen HIV 1&2, HBsAg und HCV getestet und waren negativ. Jedoch kann durch keine Testmethode das Vorhandensein von HIV, HBV, HCV oder anderer infektiöser Krankheitserreger mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Deshalb sollten die Kalibratoren und Kontrollen als potentiell infektiös betrachtet und entsprechend behandelt werden.
- Manche Reagenzien enthalten kleine Mengen an Proclin 300 als Konservierungsmittel. Kontakt mit der Haut oder Schleimhaut vermeiden.
- Das TMB-Substrat enthält eine reizende Substanz, die beim Einatmen, Verschlucken oder der Aufnahme über die Haut gesundheitsschädlich sein kann. Um eine Schädigung zu verhindern, Einatmen, Verschlucken oder Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure. Schwefelsäure ist giftig und ätzend und kann bei Einnahme toxisch sein. Um Verätzungen zu verhindern, Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Reagenz TMB/H₂O₂ keinem direkten Sonnenlicht, Metallen oder Oxidationsmitteln aussetzen. Die Lösung nicht einfrieren.
- Mit diesem Verfahren können Ferritin-Konzentrationen von 5 ng/mL bis 1000 ng/mL bestimmt werden.

5 VORSICHTSMASSNAHMEN

- Die Reihenfolge der Pipettierschritte muss genau wie in dieser Anleitung angegeben eingehalten werden. Die hier dargestellten Daten zur Performance wurden unter Verwendung der in dieser Gebrauchsanweisung genannten spezifischen Reagenzien ermittelt.
- Alle Reagenzien im Originalbehälter kühl bei 2 °C bis 8 °C lagern. Ausnahmen werden deutlich gekennzeichnet. Bei sachgemäßer Lagerung und Verwendung sind die Reagenzien bis zum Verfalldatum haltbar.
- Vor der Verwendung müssen alle Testkit-Komponenten und Proben Raumtemperatur (22 °C bis 28 °C) annehmen und gut gemischt werden.
- Die Testkit-Komponenten zwischen unterschiedlichen Chargen nicht austauschen. Das auf dem Karton und den Fläschchen aufgedruckte Verfalldatum muss eingehalten werden. Die Testkit-Komponenten nach Ablauf ihres Verfalldatums nicht mehr verwenden.
- Wenn Sie automatische Geräte verwenden, unterliegt es Ihrer Verantwortung zu überprüfen, ob die Tests mit dem Kit ordnungsgemäß durchgeführt wurden.
- Unvollständige oder ungenaue Entfernung der Flüssigkeit aus den Vertiefungen kann die Testpräzision beeinträchtigen und/oder den Hintergrund verstärken. Bei Verwendung von automatischen Systemen wird empfohlen die Anzahl der Waschschrte zu erhöhen, um die Test-Performance zu verbessern.
- Die Reaktionszeit muss für alle Vertiefungen konstant gehalten werden, damit die Ergebnisse reproduzierbar sind. Das Pipettieren der Proben sollte nicht länger als 10 Minuten dauern, um Testabweichungen zu vermeiden. Falls mehr als 10 Minuten benötigt werden, muss die Reihenfolge des Pipettierens eingehalten werden. Bei Verwendung von mehreren Platten wird empfohlen, die Dosis-Wirkungs-Kurve für jede Platte zu wiederholen.
- Durch die Zugabe der TMB-Substratlösung wird eine kinetische Reaktion gestartet, die durch das Hinzufügen der Stopplösung beendet wird. Deshalb müssen die TMB-Substrat- und die Stopplösung jeweils in derselben Reihenfolge pipettiert werden, um Zeitabweichungen während der Reaktion zu vermeiden.
- Die Richtlinien zur Qualitätskontrolle im medizinischen Labor müssen befolgt werden, indem Kontrollen und/oder vereinigte Serumproben mit untersucht werden.
- Beim Lösen und Pipettieren der Reagenzien ist größte Genauigkeit erforderlich.
- Mikrobiell kontaminierte, stark lipämische oder hämolysierte Proben nicht im Test verwenden.
- Mikrotiterplatten-Lesegeräte lesen vertikal ab. Nicht die Unterseite der Vertiefungen berühren.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Vorbereitung der Standards

Die Standards sind gebrauchsfertig und auf den 1. Internationalen WHO-Standard für Ferritin 80/602 kalibriert. Sie haben folgende Konzentrationen:

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
ng/mL	0	5	20	100	400	1000

Proben mit einer Konzentration über 1000 ng/mL mit dem Nullstandard S₀ verdünnen. Nach dem Öffnen sind die Standards 6 Monate bei 2 °C bis 8 °C haltbar.

6.2 Vorbereitung der Waschlösung

Der Inhalt jeder Flasche der gepufferten konzentrierten Waschlösung (10X) muss vor der Verwendung mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 mL aufgefüllt werden. Bei kleineren Volumina entsprechend im Verhältnis 1:10 verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist 30 Tage bei 2 °C bis 8 °C haltbar. Möglicherweise sind in der konzentrierten Waschlösung Kristalle sichtbar, in diesem Fall bei Raumtemperatur mischen, bis sich die Kristalle vollständig aufgelöst haben. Um die Genauigkeit zu erhöhen, den gesamten Inhalt der Flasche mit konzentrierter Waschlösung auf 500 mL auffüllen und dabei darauf achten, dass auch die Kristalle mit übertragen werden, anschließend mischen, bis sich die Kristalle vollständig aufgelöst haben.

6.3 Vorbereitung der Proben

Die Ferritinbestimmung wird mit Humanserum oder Plasma durchgeführt.

Die Proben können bei 2 °C bis 8 °C für kurze Zeit gelagert werden (maximal fünf Tage).

Bei längerer Lagerung Proben bei -20 °C einfrieren. Wiederholtes Auftauen und Wieder-Einfrieren vermeiden. Die Kontrolle ist gebrauchsfertig.

6.4 Test-Verfahrensweise

- Alle Reagenzien müssen vor Gebrauch Raumtemperatur annehmen (22 °C bis 28 °C). Am Ende der Testdurchführung die Reagenzien sofort wieder bei 2 °C bis 8 °C lagern, längere Zeiten bei Raumtemperatur möglichst vermeiden.
- Nicht verwendete beschichtete Mikrotiter-Streifen müssen wieder zusammen mit dem beigefügten Trockenmittel in den Folienbeutel zurückgelegt werden, der Beutel muss fest verschlossen und bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.
- Damit keine mikrobielle oder chemische Kontamination auftreten kann, nicht verwendete Chemikalien nicht wieder in das Originalfläschchen zurückfüllen.
- Da der Test zur Erhöhung der Genauigkeit der Testergebnisse als Doppelbestimmung durchgeführt wird, für jeden Punkt der Kalibrierungskurve (S₀-S₅) zwei Vertiefungen, für jede Kontrolle und jede Probe ebenfalls zwei Vertiefungen und für den Nullwert eine Vertiefung vorbereiten.

Reagenz	Standard	Probe/ Kontrolle	Nullwert
Probe/Kontrolle		20 µL	
Standard S ₀ -S ₅	20 µL		
Konjugat	100 µL	100 µL	
1 Stunde bei Raumtemperatur (22 °C bis 28 °C) inkubieren. Inhalt der Vertiefungen entfernen. Die Vertiefungen 3-mal mit 300 µL verdünnter Waschlösung waschen. Wichtiger Hinweis: bei jedem Waschschrift die Platte 5 Sekunden vorsichtig schütteln. Überschüssige Flüssigkeit durch Aufschlagen der umgedrehten Platte auf saugfähigem Papier entfernen. Waschautomat: Bei Verwendung eines Waschautomaten die Vertiefungen mindestens 5-mal waschen.			
TMB-Substrat	100 µL	100 µL	100 µL
10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (22 °C bis 28 °C) inkubieren.			
Stopplösung	100 µL	100 µL	100 µL
Die Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln. Die Absorption (E) innerhalb von 5 Minuten bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge von 620 - 630 nm oder gegen den Nullwert messen.			

7 QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte zur Überprüfung der Test-Performance Kontrollen mit normalen, hohen und niedrigen Ferritin-Spiegeln testen. Diese Kontrollen sollten wie unbekannte Proben behandelt und die Werte in jedem durchgeführten Testlauf bestimmt werden. Die Aufzeichnungen der Qualitätskontrolle sollten aufbewahrt werden, um die Performance der Kit-Reagenzien verfolgen zu können. Angemessene statistische Methoden sollten zur Ermittlung von Trends angewendet werden. Jedes Labor sollte Grenzwerte für eine ausreichende Test-Performance festlegen. Die Achsenabschnitte der Standardkurve bei 80 %, 50 % und 20 % sollten zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit zwischen den verschiedenen Durchläufen als weitere Parameter ebenfalls überwacht werden. Außerdem sollte die maximale Absorption mit den bisher gesammelten Werten übereinstimmen. Treten deutliche Abweichungen gegenüber der bisherigen Performance auf, so kann das auf unbemerkte Änderungen der Testbedingungen oder verdorbene Kit-Reagenzien hinweisen. Um die Ursache der Abweichungen zu ermitteln, sollten frische Reagenzien verwendet werden.

8 ERGEBNISSE

Mittlere Extinktion

Für jeden Punkt der Standardkurve (S_0 - S_5) und für jede Probe jeweils die mittlere Extinktion (E_m) berechnen.

Standardkurve

Die mittlere Extinktion der Standards (E_m) gegen die Konzentration auftragen. Dann eine Ausgleichskurve durch die aufgetragenen Punkte zeichnen (z. B. kubische Spline-Funktion oder Vier-Parameter-Funktion).

Ermittlung der Ergebnisse

Mit den Werten für die Proben die entsprechenden Werte für die Konzentration in ng/mL aus der Standardkurve ablesen.

9 REFERENZWERTE

Für die Serumwerte gelten folgende Bereiche:

		Mittelwert (ng/mL)	Wertebereich (ng/mL)
Frauen	Frauen vor der Menopause	53	6 - 180
	Frauen nach der Menopause	105	8 - 350
Männer		175	20 - 400

Bitte beachten, dass die Ermittlung des zu erwartenden Wertebereichs für eine „normale“ Population mit einer bestimmten Methode von vielen Faktoren, wie der Spezifität und Sensitivität der verwendeten Methode und der Zusammensetzung der untersuchten Population, abhängt. Deshalb sollten die Labors den vom Hersteller etablierten Wertebereich nur als allgemeine Orientierung verwenden und jeweils einen eigenen zu erwartenden Wertebereich mit der Bevölkerung im Einzugsbereich des Labors erstellen.

10 TESTCHARAKTERISTIKA

Daten hierzu entnehmen Sie bitte der englischen Gebrauchsanweisung.

11 ENTSORGUNG

Bei der Entsorgung der Reagenzien sind die örtlichen Vorschriften zu beachten.

12 LITERATUR

- Walter G.O., et al J. Clin. Path . 29 770 - 772 (1973)
 Watanabe, N. et al Clin. Chem., 25/1, 80 – 82 (1979)
 Van Oost, S.A. et al Clin. Chem , 28/12, 2429 – 2433 (1982)
 Ronald H, et al Clin. Chem ., 29/6, 1109 - 1113 (1983)

13 FEHLERBEHEBUNG (TROUBLESHOOTING)

MÖGLICHE FEHLERQUELLEN/ LÖSUNGEN

Keine kolorimetrische Reaktion

- kein Konjugat pipettiert (Reaktion erfolgt nach Zugabe)
- Kontamination des Konjugats und / oder Substrats
- Fehler bei der Durchführung des Testverfahrens (z. B. versehentliches Pipettieren der Reagenzien in der falschen Reihenfolge oder aus einem falschen Fläschchen etc.)

Zu geringe Reaktion (OD-Werte zu niedrig)

- falsches Konjugat (z. B. nicht aus dem Original-Testkit stammend)
- Inkubationszeit zu kurz, Inkubationstemperatur zu niedrig

Zu starke Reaktion (OD-Werte zu hoch)

- falsches Konjugat (z. B. nicht aus dem Original-Testkit stammend)
- Inkubationszeit zu lang, Inkubationstemperatur zu hoch
- Wasserqualität für den Waschpuffer nicht ausreichend (geringe Wasserqualität oder entionisiertes Wasser)
- unzureichendes Waschen (Konjugat nicht ordnungsgemäß entfernt)

Unerklärliche Ausreißer

- Kontamination der Pipetten, Spitzen oder Behälter
- unzureichendes Waschen (Konjugat nicht ordnungsgemäß entfernt)

Zu hoher Variationskoeffizient (VK) innerhalb des Laufs

- Reagenzien und / oder Streifen vor Gebrauch nicht auf Raumtemperatur aufgewärmt
- Mikrotiterplatten-Waschgerät wäscht nicht ordnungsgemäß (Vorschlag: Waschkopf reinigen)

Zu hoher Variationskoeffizient (VK) zwischen verschiedenen Läufen

- Inkubationsbedingungen nicht konstant (Zeit, Temperatur)
- Kontrollen und Proben nicht zur selben Zeit pipettiert (mit denselben Intervallen) (Pipettierreihenfolge überprüfen)
- personenabhängige Abweichungen

1 DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di Ferritina nel siero o plasma umano. Il kit Ferritin ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1.1 SIGNIFICATO CLINICO

La Ferritina è una proteina globulare presente principalmente nel fegato, che può immagazzinare circa 2250 ioni di ferro (Fe^{3+}). La molecola di ferritina (apoferritin) è composta da unità secondarie pesanti e leggere, che circondano un nucleo cristallino che contiene l'ossido ed il fosfato di ferro. La Ferritina è sintetizzata nel fegato, nella milza e in numerosi altri tessuti, le concentrazioni maggiori sono presenti nel fegato, nella milza, nel midollo osseo e nel mucosa intestinale. I livelli di ferritina hanno una correlazione diretta con la quantità totale di ferro immagazzinata nel corpo. Se il livello di ferritina è alto, il ferro in eccesso è espulso. Se il livello di ferritina è basso, vi è un rischio di carenza di ferro che potrebbe condurre all'anemia. Nella regolazione dell'anemia, la misurazione della ferritina sierica è la prova di laboratorio più sensibile per valutare l'anemia da mancanza del ferro. In opposizione, livelli di ferritina sierica normali o aumentati sono connessi all'anemia cronica. Livelli elevati di ferritina nel siero sono stati osservati nelle affezioni epatiche acute e croniche e nella leucemia e linfoma di Hodgkin. Livelli elevati di ferritina nel siero sono stati associati anche con un rischio elevato di infarto miocardico negli uomini. Ferritin inoltre è usato come indicatore per i disordini dovuti al sovraccarico di ferro, quali l'emocromatosi il livello di ferritina può essere elevato. La Ferritina è un reattivo di fase-acuta, è spesso elevata nel corso della malattia. Il ferro libero è tossico alle cellule ed il corpo ha un insieme elaborato dei meccanismi protettivi per legare il ferro in vari scompartimenti dei tessuti. All'interno delle cellule, il ferro è immagazzinato complessato a proteine come la ferritina o l'emosiderina. L'apoferritina lega il ferro ferroso libero e lo immagazzina come ferrico. In condizioni normali il livello di ferritina nel siero è in equilibrio con i depositi di ferro; quindi, il livello di ferritina sierica è la prova di laboratorio più efficace per valutare i depositi del ferro.

2 PRINCIPIO DEL METODO

Il Ferritina ELISA è basato sulla cattura simultanea della Ferritina umana da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastra, l'altro coniugato con la perossidasi di rafano (HRP). Dopo un determinato periodo di incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida. Successivamente, l'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB-Substrate (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H_2SO_4). L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di Ferritina presente nel campione. La concentrazione della Ferritina nel campione è calcolata in base ad una curva standard.

3 REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1 Reattivi e materiali forniti nel kit

- CAL 0 Zero Standard S0** (1 flacone) 3 mL e
CAL 1 - 5 Ferritina Standard (Standard 1 - 5), 5x (1 flacone = 1 mL)
- CONTROL** Ferritin **Control** (1 vial) 1 mL
La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi
- ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (1 flacone) 12 mL
Anticorpo anti Ferritin coniugato a Perossidasi di rafano (HRP)
- SORB MT Microtiterwells** (1 micropiastra breakable)
Anticorpo anti assorbito sulla micropiastra
- SUB TMB Substrate Solution** (1 flacone) 15 mL
 H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)
- STOP SOLN Stop Solution** (1 flacone) 15 mL
Acido Solforico 0.15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)
- WASH SOLN 10x Wash Solution 10X** (1 flacone) 50 mL
Tampone fosfato 0,2M, pH 7.4

3.2 Reattivi necessari non forniti nel kit

- Acqua distillata.

3.3 Materiale e strumentazione ausiliare

- Dispensatori automatici.
- Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note: Conservare tutti i reattivi a 2 °C - 8 °C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit

Evitare di staccare l'etichetta adesiva dalle strip che non vengono utilizzate nella seduta analitica

4 AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori ed i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300 come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Ferritina da 5 ng/mL a 1000 ng/mL.

5 PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2 °C - 8 °C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6 PROCEDIMENTO

6.1 Preparazione degli Standard (S₀, S₁, S₂, S₃, S₄, S₅)

Gli standards sono pronti all'uso, sono calibrati contro il WHO 1st IS Ferritin Human Liver 80/602 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
ng/mL	0	5	20	100	400	1000

Per campioni con concentrazione superiore a 1000 ng/mL diluite il campione con S₀. Una volta aperti, gli standards sono stabili 6 mesi a 2 °C - 8 °C.

6.2 Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2 °C - 8 °C per almeno 30 giorni. Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

6.3 Preparazione del campione

La determinazione della Ferritina si effettua su siero o plasma umano. Il campione può essere conservato a 2 °C - 8 °C per un breve periodo (massimo 5 giorni). Per periodi più lunghi, conservare il campione a -20 °C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento. Il Controllo è pronto all'uso.

6.4 Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2 °C - 8 °C, evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2 °C - 8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (S_0 - S_5), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Standard	Campione/Controllo	Bianco
Campione /Controllo		20 µL	
Standard S_0 - S_5	20 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C). Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0.3 mL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 10 minuti a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7 CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Ferritina per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva standard per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8 RISULTATI

Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (E_m) di ciascun punto della curva standard (S_0 - S_5) e di ogni campione.

Curva Standard

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (E_m) di ciascuno standard in funzione delle concentrazioni.

Tracciare la miglior curva passante per i punti standard (es: Cubic Spline o Four Parameter Logistic).

Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in ng/mL.

9 VALORI DI RIFERIMENTO

I valori serici di Ferritina sono compresi nei seguenti intervalli:

		Media (ng/mL)	Range (ng/mL)
Donne	età fertile	53	6 - 180
	post-menopausa	105	8 - 350
Uomini		175	20 - 400

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10 PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1 Precisione

10.1.1 Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (15x) il dosaggio di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è $\leq 7,5\%$.

10.1.2 Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (16x) il dosaggio di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 6,1\%$.

10.2 Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate in base al rapporto in massa:

Liver Human Iso-Ferritin	100 %
Splean Human Iso-Ferritin	80 %
Hearth Human Iso ferritin	12 %

10.3 Accuratezza

La prova di recupero condotta su campione arricchito con 12.5 – 25 – 50 – 100 – 200 ng/mL di Ferritina, ha dato un valore medio (\pm SD) di $98,66\% \pm 2,90\%$.

La prova di diluizione effettuata su 3 campioni diluiti fino a 8 volte ha dato un valore medio (\pm SD) di $102,11\% \pm 5,32\%$.

10.4 Sensibilità

La concentrazione minima di Ferritina misurabile che può essere distinta dallo Standard 0 è 0,04 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.5 Correlazione con il dosaggio RIA

Il kit Ferritina (DE4408) è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati i campioni di siero di 22 donne e 32 uomini. La curva di regressione è:

(Ferritin DE4408) = $1,11 * (\text{Ferritin Diasorin}) - 10,46$

$r^2 = 0,972$

10.6 Effetto "Hook"

In questo metodo non è stato osservato effetto Hook fino a 50000 ng/mL.

11 DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

12 BIBLIOGRAFIA

Walter G.O., et al J. Clin. Path. 29 770 - 772 (1973)
Watanabe, N. et al Clin. Chem., 25/1 80 – 82 (1979)
Van Oost, S.A. et al Clin. Chem 28/12, 2429 – 2433 (1982)
Ronald H, et al Clin. Chem 29/6, 1109 - 1113 (1983)

13 SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intra-assay elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperature ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% inter-assay elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

1 USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de Ferritina en suero y plasma. El kit Ferritin ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1.1 IMPORTANCIA CLÍNICA

La ferritina es una proteína globular que se encuentra principalmente en el hígado, que puede almacenar alrededor de 2250 iones de hierro (Fe^{3+}). La molécula de ferritina (apoferritina) se compone de subunidades pesadas y ligeras alrededor de un núcleo cristalino que contiene óxido de hierro y fosfato. La ferritina es sintetizada en el hígado, el bazo y en muchos otros tejidos, las mayores concentraciones están presentes en el hígado, bazo, médula ósea y la mucosa intestinal. Los niveles de ferritina tienen una correlación directa con la cantidad total de hierro almacenado en el cuerpo. Si el nivel de ferritina es alto hay un exceso de hierro que se excretará. Si el nivel de ferritina es bajo, se corre el riesgo de deficiencia de hierro que podría conducir a la anemia. En el contexto de la anemia, la medición de la ferritina sérica es la prueba de laboratorio más sensible en la evaluación de la anemia por deficiencia de hierro. En contraste, los niveles de ferritina sérica pueden ser elevados o normales en las anemias asociadas a enfermedades crónicas. Niveles elevados de ferritina sérica se han observado en la enfermedad hepática aguda o crónica, en la leucemia y en el linfoma de Hodgkin. Los niveles elevados de ferritina sérica se asocian con un mayor riesgo de infarto de miocardio en los hombres. La ferritina también se utiliza como un indicador de los trastornos debidos a la sobrecarga de hierro como en la hemocromatosis, en la cual los niveles de ferritina pueden estar elevados. La ferritina es un reactante de fase aguda, con frecuencia se eleva el curso de las enfermedades. El hierro libre es tóxico para las células y el cuerpo tiene un elaborado conjunto de mecanismos de protección para unir el hierro en diferentes compartimentos de los tejidos. Dentro de las células, el hierro se almacena en forma de complejo con algunas proteínas como la ferritina o la hemosiderina. El apoferritina se une al hierro ferroso libre y lo almacena en su estado ferrico. En condiciones normales, el nivel de ferritina sérica está en equilibrio con los depósitos de hierro, por lo que el nivel de ferritina sérica es la prueba de laboratorio más eficaz para evaluar las reservas de hierro.

2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba Ferritin ELISA se basa en la captura simultánea de la Ferritin por dos anticuerpos monoclonales humanos, uno inmovilizado en la placa de microtitulación y el otro conjugado con peroxidasa de rábano otros (HRP). Después de un cierto período de incubación la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida. Por último, al reaccionar con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato TMB, la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de parada (H_2SO_4). La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de Ferritina en la muestra. La concentración de Ferritina en la muestra se calcula a partir de una curva de calibración.

3 REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores:

CAL 0 Zero Standard (1 frasco) 3 mL and

CAL 1 - 5 Standard (Standard 1 - 5), 5x (1 frasco = 1 mL)

2. **CONTROL** Ferritin Control (Control) (1 frasco) 1 mL

La concentración del Control se indica en el certificado de análisis (Certificate of Analysis).

3. **ENZ CONJ** Enzyme Conjugate (Conjugado) (1 frasco) 12 mL

Anticuerpo anti Ferritina conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)

4. **SORB MT** Microtiterwells (Microplaca recubierta) (1 microplaca divisible)

Anticuerpo anti Ferritina absorbido en la microplaca

5. **SUB TMB** Substrate Solution (Substrato TMB) (1 frasco) 15 mL

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (evítese el contacto con la piel)

6. **STOP SOLN** Stop Solution (Solución de parada) (1 frasco) 15 mL

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evítese el contacto con la piel)

7. **WASH SOLN 10x** Wash Solution 10X (Solución de lavado conc. 10X) (1 frasco) 50 mL.

Tampón fosfato 0.2 M, pH 7.4

3.2 Reactivos necesarios no incluidos en el kit

- Agua destilada

3.3 Material e instrumental auxiliar

- Dispensadores automáticos
- Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 °C - 8 °C.

Atemperar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

No separe la hoja adhesiva de las tiras que no vaya a utilizar de inmediato.

4 ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los Controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300 como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Con este método pueden determinarse cuantitativamente valores de Ferritina desde 5 hasta 1000 ng/mL.

5 PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2 °C - 8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente. Por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6 PROCEDIMIENTO

6.1 Preparación de los Calibradores (S₀, S₁, S₂, S₃, S₄, S₅)

Los Calibradores son listo para usar, son calibrados frente al estándar internacional WHO 1st IS Ferritin Human Liver 80/602, y tienen las siguientes concentraciones:

	S ₀	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
ng/mL	0	5	20	100	400	1000

Para muestras con una concentración superior a 1000 ng/mL, diluir la muestra con Calibrador 0. Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2 °C - 8 °C.

6.2 Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la " Wash Solution 10X " con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2 °C - 8 °C durante al menos 30 días. En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.3 Preparación de la muestra

La determinación de Ferritina se puede realizar en el plasma o suero humano. Las muestras se pueden conservar refrigeradas a 2 °C - 8 °C durante un máximo de 5 días. Si no es posible analizarlas en dicho periodo de tiempo, se pueden conservar a una temperatura de -20 °C. Evite los ciclos de congelación y descongelación repetidos. El Control es listo para usar.

6.4 Procedimiento

- Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) **durante al menos 30 minutos**. Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2 °C - 8 °C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2 °C - 8 °C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (S₀-S₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/Control	Blanco
Calibrador S ₀ -S ₅	20 µL		
Muestra/Control		20 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
TMB Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 10 minutos a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7 CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar controles para los rangos bajo, medio y alto de ferritina para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8 RESULTADOS

8.1 Absorbancia media

Calcular la extinción media (Em) de cada punto de la curva de calibración (S₀-S₅) y de cada muestra.

8.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los Calibradores (S₀-S₅). Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3 Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en ng/mL.

9 VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones de Ferritina en suero o plasma están incluidas en los siguientes intervalos:

		Media (ng/mL)	Rango (ng/mL)
Mujeres	fértil	53	6 - 180
	post menopausicas	105	8 - 350
Varones		175	20 - 400

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1 Precisión

10.1.1 Intra ensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (15x) tres niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es $\leq 7,5\%$.

10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo (16x) tres niveles diferentes de suero de control con kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es $\leq 6,1\%$.

10.2 Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas:

Liver Human Iso-Ferritin	100 %
Splean Human Iso-Ferritin	80 %
Heart Human Iso-Ferritin	12 %

10.3 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 12,5 - 25 - 50 - 100 - 200 ng/mL de Ferritina ha dado un valor medio (\pm SE) de $98,66\% \pm 2,90\%$. La prueba de dilución conducta en tres muestras diluidas 8 veces dió una media (\pm SD) de $102,11\% \pm 5,32\%$.

10.4 Sensibilidad

La concentración mínima de Ferritina detectable que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 0,04 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

10.5 Correlación

El Ferritin ELISA DE4408 fue comparado con otro ensayo comercial de Ferritina. Se analizaron 22 muestras de suero de mujeres y 32 de hombres. Se calculó la curva de regresión lineal:

$$(DE4408) = 1,11 * (\text{Ferritin Diasorin}) - 10,46$$

$$r^2 = 0,972$$

10.6 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo (principio de unión competitiva) hasta 50,000 ng/mL.

11 INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia.

12 BIBLIOGRAFÍA

- Walter G.O., et al J. Clin. Path . 29 770 - 772 (1973)
Watanabe, N. et al Clin. Chem., 25/1 80 – 82 (1979)
Van Oost, S.A. et al Clin. Chem 28/12, 2429 – 2433 (1982)
Ronald H, et al Clin. Chem 29/6, 1109 - 1113 (1983)

13 SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore