


EIAgen Ferritin KIT

REF LI4023

 96 tests

 **Adaltis Italia S.p.A.**

Via Cristoni, 12
40033 Casalecchio di Reno – (BO) Italy
Tel. +39-051-6136511 – Fax + 39-051-575280
www.adaltis.com









FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

Store at 2...8 °C



en

SYMBOLS USED ON LABELS

MTPLATE	Microplate
CONJ HRP	Conjugate
CAL0	Calibrator 0
CAL1	Calibrator 1
CAL2	Calibrator 2
CAL3	Calibrator 3
CAL4	Calibrator 4
CAL5	Calibrator 5
SUBS TMB	Substrate HS (TMB)
SOLN STOP	Stop Solution
WASH BUF 20X	Wash buffer 20X
LOT	Lot number
REF	Catalogue code
	Expiry date (use by...)
 2°C  8°C	Temperature limitation (store at 2...8°C)
	Number of tests
	Keep away from sunlight
	Manufactured by
	Attention, See Instructions For Use
IVD	In vitro diagnostic medical device (In vitro diagnostic use)
	Biological risks (see section 7 WARNINGS AND PRECAUTIONS)

1.0 INTENDED USE

EIAgen Ferritin kit is a colourimetric immunoenzymatic method for the quantitative determination of the concentration of Ferritin in human serum and plasma.

2.0 SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

One of the most prevalent human disorders is the dietary deficiency of iron and the resulting anemia (1). The assays for iron, total iron-binding capacity, and other assessments of iron compounds in the body are clinically significant (2). Iron-storage compounds in the body include hemoglobin, hemosiderin, myoglobin, and the cytochromes. In most tissues, Ferritin is a major iron-storage protein (3). Human Ferritin has a molecular weight of approximately 450,000, and consists of a protein shell around an iron core. Each molecule of Ferritin may contain as many as 4,000 iron atoms (4). Under normal conditions, this may represent 25% of the total iron found in the body. In addition, Ferritin can be found in several isomers (5). High concentrations of Ferritin are found in the cytoplasm of the reticuloendothelial system, liver, spleen, and bone marrow (6). Methods previously used to measure iron in such tissues are invasive, cause patient trauma and lack adequate sensitivity (7). The measurement of Ferritin in serum is useful in determining changes in body iron storage, and is non-invasive with relatively little patient discomfort. Serum Ferritin levels can be measured routinely and are particularly useful in the early detection of iron-deficiency anemia in apparently healthy people (8, 9). Serum Ferritin measurements are also clinically significant in the monitoring of the iron status of pregnant women, blood donors, and renal dialysis patients. High Ferritin levels may indicate iron overload without apparent liver damage, as may be noted in the early stages of idiopathic hemochromatosis (10). Ferritin levels in serum have also been used to evaluate clinical conditions not related to iron storage, including inflammation, chronic liver disease, and malignancy (11).

3.0 PRINCIPLE OF THE ASSAY

EIAgen Ferritin kit is based on the simultaneous binding of human Ferritin to two monoclonal antibodies: one immobilized on microwell plates, the other conjugated with horseradish peroxidase (HRP).

After incubation the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing. The enzyme in the bound fraction reacts with the Substrate (TMB) developing a blue colour that turns into yellow after adding the Stop solution (H₂SO₄).

The Ferritin concentration in the sample is calculated on the basis of a series of calibrators.

The color intensity is proportional to the Ferritin concentration in the sample.

4.0 CONTENT OF THE KIT

4.1 MICROPLATE (code 15PIA)

MTPLATE

1 microplate, 12 x 8 breakable wells coated with monoclonal Anti-Ferritin antibodies.

Store at 2-8°C.

4.2 CALIBRATORS

6 vials containing human liver Ferritin with gentamicin 0.01% as preservative.

Open the package of coated microplate only when it is at room temperature and close immediately after use.

Store at 2-8°C.

Calibrator	Symbol	Code	Concentration*	Volume
Calibrator 0	CAL0	15CAL0	0 ng/mL	3 mL
Calibrator 1	CAL1	15CAL1	5 ng/mL	1.0 mL
Calibrator 2	CAL2	15CAL2	20 ng/mL	1.0 mL
Calibrator 3	CAL3	15CAL3	100 ng/mL	1.0 mL
Calibrator 4	CAL4	15CAL4	400 ng/mL	1.0 mL
Calibrator 5	CAL5	15CAL5	1000 ng/mL	1.0 mL

* approximate concentration.

The calibrators are calibrated against the WHO 1st IS Ferritin Human Liver 80/602

4.3 CONJUGATE (code 15HRP)

CONJ|HRP

1 vial containing 13 ml monoclonal anti-Ferritin antibody conjugate to horseradish peroxidase (HRP).

Ready to use.
Store at 2-8°C.

4.4 SUBSTRATE HS (LS.TMB-H202.HK)

SUBS|TMB

1 vial containing 13 ml of a stabilized mixture of TMB 0.25g/l (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) and H₂O₂ (Hydrogen Peroxide).

Ready to use.
Store at 2-8°C.

4.5 STOP SOLUTION (LS.STOP.K)

SOLN|STOP

1 vial containing 13 ml of H₂SO₄ 0.3 M.

Ready to use.
Store at 2-8°C
The MSDS is available upon request of laboratory personnel

4.6 WASH BUFFER 20X (cod. TLAVD) **WASH|BUF|20X**

1 bottle containing 50 ml of concentrated washing buffer, containing phosphate buffer 50mM pH 7.4 and Tween20 1g/l.

Preparation of Wash Buffer working solution: dilute contents of wash buffer concentrate (50 ml) to 1000 ml with distilled water.

STORAGE store at room temperature (20-27°C). Stable until kit expiry date.

5.0 STORAGE AND STABILITY AFTER THE FIRST OPENING

- Kit components should be stored at 2-8°C and should be protected against sunlight.

6.0 MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Distilled water
- Automatic dispensers.
- Microplate reader capable of measuring the O.D.s at 450, 405 and 620 nm
- Precision pipettes: 0.02 and 0.1 ml
- Disposable pipette tips
- Absorbent paper
- Graph paper
- Control sera

7.0 WARNINGS AND PRECAUTIONS

7.1 SAFETY PRECAUTIONS

- Reagents contain Proclin 300^R and Gentamicin as preservatives.
- Avoid contact with reagents containing hydrogen peroxide, sulphuric acid and preservatives which may be toxic if ingested. Do not pipette by mouth.
- Calibrators contain human serum. They have been found to be non reactive for HbsAg and to anti-HIV antibodies by FDA; however, these products should be handled as potentially hazardous.
- Follow all local, state and national regulations for disposal of all waste material.

7.2 TECHNICAL PRECAUTIONS

- Follow the utmost precision when diluting and dispensing the reagents.
- Do not use reagents belonging to different lots.
- Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is carried out with a complete understanding of the package insert instructions and with adherence to good laboratory practice.
- The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance readings.

8.0 SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Ferritin determination can be carried out using either plasma or serum. If dispensing does not occur by five days from gathering, store specimen at -20°C.

9.0 ASSAY PROCEDURE

9.1 PREPARATION FOR ASSAY

- All reagents should be allowed to reach room temperature (18-25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or swirling prior to use. Do not induce foaming
- Since it is necessary to assay in duplicate, two wells should be prepared for each point of the Standard curve (0-5 Calibrators), two for each Specimen and one for the Blank.

9.2 PIPETTING AND INCUBATION STEPS

- Dispense** 20 µl of each calibrator and specimen in duplicate, leaving one well empty for the blank.
- Dispense** 100 µl of conjugate into the wells of calibrators and specimen; do not add conjugate into the Blank well.
- Incubate** 1 h at +22-28°C (room temperature).
- Remove** the reagent mixture, then **wash** dispensing 0.3 ml diluted wash solution into each well; wash twice again so as to completely remove the liquid.
- Dispense:** 100 µl Substrate into each well.
- Incubate** 10 minutes in the dark at room temperature (22+28°C).
- Dispense:** 100 µl Stop Solution into each well.
- Read** optical density, within 30 minutes, at 450 nm and 405 nm setting the reference filter at 620 nm. If it is possible to do it automatically, adjust the reader to zero using the Blank.

10.0 CALCULATION OF RESULTS

10.1 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that all controls (low, medium, and high) are run. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

10.2 OD CONVERSION

The optical densities (O.D.s) of some calibrators and samples may be higher than 2.0; in such a case, they could be out of the measurement range of the microplate reader. It is therefore necessary, for O.D.s higher than 2.0, to perform a reading at 405 nm (=wavelength of peak shoulder) in addition to 450

nm (peak wavelength) and 620 (reference filter for the subtraction of interferences due to the plastic).

For microplate readers unable to read the plate at 3 wavelengths at the same time, it is advisable to proceed as follows:

- Read the microplate at 450 nm and at 620 nm.
- Read again the plate at 405 nm and 620 nm.
- Find out the wells whose ODs at 450 nm are higher than 2.0
- Select the corresponding ODs read at 405 nm and multiply these values at 405 nm by the conversion factor 3.0 (where OD 450/OD 405 = 3.0), that is: $OD\ 450\ nm = OD\ 405\ nm \times 3.0$

Warning: The conversion factor 3.0 is suggested only. For better accuracy, the user is advised to calculate the conversion factor specific for his own reader.

10.3 DATA REDUCTION - AUTOMATED METHOD

Subtract the Blank OD from calibrator and sample ODs

Use the 4 parameters logistic – preferred – or the smoothed cubic spline function as calculation algorithm.

10.4 DATA REDUCTION - MANUAL METHOD

- Subtract the Blank OD from calibrator and sample ODs
- Calculate the average OD for each point in the standard curve and for each sample.
- Log-to-log draw on paper the values of Ferritin calibrators, then extrapolate the straight line.
- Read the corresponding Ferritin concentrations of controls and samples

10.5 MEASUREMENT RANGE

The present method allows the determination of Ferritin concentrations from 5 ng/ml to 1,000 ng/ml. Use the zero calibrator to dilute samples having concentrations > 1,000 ng/ml.

11.0 EXPECTED VALUES

Each laboratory should establish its own range on the basis of the patients' population.

The Ferritin plasma values are included in the following ranges:

Number of patients	Mean (ng/mL)	Range (ng/mL)
Fertile women:50	53	6 - 180
Women in post-menopause: 30	105	8 – 350
Men 50	175	20 - 400

12.0 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- No "hook effect" was observed up to 50,000 ng/ml of Ferritin with the present method.
- No interferences from rheumatoid factors, bilirubin, hemoglobin, cholesterol, triglycerides have been observed with the present method.
- For diagnostic purposes, the results obtained by this test should be used as an adjunct to other data (e.g., symptoms, results of other tests, clinical impressions) available to the physician.

13.0 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1 PRECISION

a) Within-run precision.

Within-run precision has been evaluated by replicate determinations on three different control sera assayed in one assay. The within-run variability is reported below:

Serum sample	1	2	3
Number of replicates	16	16	16
Average Ferritin (ng/mL)	15.6	76.1	160.2
Standard Deviation	0.84	2.8	5.2
% CV	5.4	3.7	3.24

b) Between-run precision.

Between-run precision has been evaluated on three different control sera assayed in two different analyses. The between-run variability is reported below:

Serum sample	1	2	3
Number of replicates	16	16	16
Average Ferritin (ng/mL)	15.4	78.2	165.2
Standard Deviation	0.88	3.6	6.93
CV%	5.7	4.6	4.2

13.2 RECOVERY

Two patients were given known quantities of Ferritin in growing amount. The average recovery compared to the previous concentrations was 98.0 %.

	Expected Concentration (ng/ml)	Observed Concentration (ng/ml)	Recovery %
SAMPLE 1			
Q. added: 18			
50 ng/ml	68.0	65.0	95.6
100 ng/ml	118	122	103.4
200 ng/ml	218	210	96.3
SAMPLE 2			
Q. added: 128			
50 ng/ml	178	169	94.9
100 ng/ml	228	234	102.6
200 ng/ml	328	317	96.6
SAMPLE 3			
Q. added: 8.7			
12.5 ng/ml	21.2	22.4	106.2
25 ng/ml	33.7	31.8	94.4
50 ng/ml	58.7	56.4	96.1
100 ng/ml	108.7	105.9	97.4

13.3 LINEARITY

Two patient samples were serially diluted with zero calibrator for a linearity study. The mean recovery was 103.5 %.

	Expected Concentration (ng/mL)	Observed Concentration (ng/mL)	Expected%
Sample 1			
Dilution			
Non diluted		86	
1:2	43.0	45.1	105.4
1:4	21.5	22.1	102.8
1:8	10.75	12.4	107.9
Sample 2			
Dilution			
Non diluted		128	
1:2	64	65	101.6
1:4	32	30.4	93.7
1:8	16	17.1	106.1

13.4 METHOD COMPARISON

The ElAgen Ferritin kit (y) was compared to another RIA commercial method (x).

$$Y = 2.8 + 1.06X$$

$$r=0.99$$

13.5 SENSITIVITY

The minimal detectable concentration of Human Ferritin by this assay is estimated to be 1.0 ng/mL.

13.6 SPECIFICITY

The cross-reactivity of antibodies, as calculated at 50% according to Abraham, are shown in the following table:

Iso Liver Ferritin	100.0 %
Iso Spleen Ferritin	80.0 %
Iso Heart Ferritin	12.0 %

14.0 AUTOMATION

Application protocols for the proper automation on the Adaltis microtiterstrips analyzers (Labotech, Personal Lab and Nexgen) are available upon request at Adaltis directly.

15.0 SUGGESTIONS FOR TROUBLESHOOTING

Adherence to assay procedure and specifications, as well as a correct use of reagents and proper pipetting, may help to avoid the following kinds of errors.

ERROR	POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS
OD very different (\pm 50%) from OD reported on QC	<ul style="list-style-type: none"> - incorrect dispensing volume of reagents (suggestion: check the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes) - incorrect temperature or incorrect incubation time (suggestion: more care in the incubator maintenance; note down the beginning of the incubation) - error in washing or in photometer reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments) - contamination of Substrate or Conjugate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers)
Low reproducible results	<ul style="list-style-type: none"> - not constant dispensing volume of samples or reagents (suggestion: check the pipettes precision and the correspondence between the volume dispensed by the pipette and the one required by the assay; re-calibrate again pipettes) - error in washing or in reading (suggestion: check operating or settings of respective instruments) - contamination of Substrate (suggestion: use only disposable and clean plastic containers) - pollution or degradation of reagents (suggestion: use appropriate tips, disposable and clean plastic containers for reagents and high quality distilled or equivalent water)
no colourimetric reaction	<ul style="list-style-type: none"> - some reagent not pipetted - strong contamination of Conjugate or Substrate

after addition 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)	- incubation time too short, incubation temperature too low
too high reaction (too high ODs)	<ul style="list-style-type: none"> - 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	<ul style="list-style-type: none"> - contamination of pipettes, tips or containers - inconstant and insufficient washing (conjugates not properly removed)
too high within-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> - reagents and/or strips not pre-warmed to Room Temp. prior to use - plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
too high between-run CV%	<ul style="list-style-type: none"> - 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

16.0 REFERENCES

1. Fairbanks VF, Bentler E. Hematology. Williams, Bentler, Erslev, Rundles, editors. New York:McGraw Hill;1972. p 305-26.
2. Colltrell DB. *Lab Mgmt* 1978 Feb.
3. Jacobs A, Worwood M. *Prog Hematol* 1975;9:1.
4. Forman DT, Vye MV. *Clin Chem* 1980;26(1):145-47.
5. Hazard JT, Yokota M, Arosio P, Drysdale J. *Blood* 1977;49(139).
6. Baur JD, Gradwohls. *Clin Meth and Diag* 1970;22(1):436.
7. Jacobs A. *Fed Proc* 1977;36(7).
8. Schrier S. Hematology. In: Rubenstein E, Federman D, editors. Scientific American. New York: Scientific American Inc.;1980. Chapter V.
9. White D, Kramer D, Johnson G, Dick F, Hamilton H. *A J C P* 1986 Feb.
10. Valberg L. *CMA J* 1980;122:1240.
11. Forman D, Parker S. *Ann Clin Lab Sci* 1980;10:345.
12. Engvall E. Methods in Enzymology. VanVunakis H, Langone JJ, editors. New York:Academic Press;1980. Volume 70;p 419-92.
13. Uotila M, Ruoslahti E, Engvall E. *J Immunol Methods* 1981;42:11-15.
14. Simes MA, Addiego Jr JE, Dallman PR. *Blood* 1974;43:581.
15. Walter G.O., Miller F.W., Wer wood, M. *J. Clin. Path.* 29 770 - 772 (1973)
16. Watanabe, N. Niitsu, Y. Ohtsuka, S. Kosaki, J. Kohgo, Y. Urushisaki, I. Kato, K. Ishikawa, E. *Clin. Chem.*,25/1 , 80 - 82 (1979).
17. Van Oost, S.A. Willekens, F.L.A., B.R. Van Neebors, B.R., Van Den Beld, B. *Clin. Chem* ,28/12 ,2429 - 2433 (1982).
18. Ronald H, Ng. Brown, A.B. Valdes JR *Clin. Chem* 29/6, 1109 - 1113 (1983)

EIAgen Ferritin KIT

REF LI4023

Σ 96 tests

Adaltis Italia S.p.A.








Via Cristoni, 12
40033 Casalecchio di Reno – (BO) Italy
Tel. +39-051-6136511 – Fax + 39-051-575280
www.adaltis.com

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Lagerung bei 2...8 °C



Lesen Sie die komplette Gebrauchsanweisung vor Testbeginn!
SYMBOLE, DIE AUF DEN ETIKETTEN VERWENDET WERDEN:

MTPLATE	Microplate
CONJ HRP	Conjugate
CAL0	Calibrator 0
CAL1	Calibrator 1
CAL2	Calibrator 2
CAL3	Calibrator 3
CAL4	Calibrator 4
CAL5	Calibrator 5
SUBS TMB	Substrate HS (TMB)
SOLN STOP	Stop Solution
WASH BUF 20X	Wash buffer 20X
LOT	Lotnummer
REF	Bestellnummer
	Verwendbar bis...
 2°C 8°C	Lagerung bei... (2..8 °C)
	Anzahl der Bestimmungen
	Nicht direktem Sonnenlicht aussetzen.
	Hersteller
	Achtung, Gebrauchsanweisung beachten.
IVD	In-vitro-Diagnostikum
	Biogefährdung (siehe Abschnitt 7 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN)

1.0 VERWENDUNGSZWECK

Der Testsatz EIAgen Ferritin ist ein immunenzymometrischer Assay zur quantitativen Bestimmung von Ferritin in humanem Serum oder Plasma.

2.0 PHYSIOLOGIE

Eine der am häufigsten auftretenden Störungen beim Menschen ist ein Eisenmangel und die daraus resultierende Anämie (1). Assays für Eisen, Eisenbindungskapazität und andere Nachweismethoden für Eisenkomponenten sind klinisch relevant (2). Zu den Eisenspeicherkomponenten im Körper gehören Hämoglobin, Hämosiderin, Myoglobin und die Zytochrome. In den meisten Geweben ist Ferritin das Haupteisenspeicherprotein (3). Humanes Ferritin hat ein Molekulargewicht von ca. 450000 und besteht aus einer kugelförmigen Proteinhülle, die einen Kern aus Eisenkomplexen umgibt. Jedes Ferritinmolekül enthält nicht weniger als 4000 Eisenatome (4). Unter normalen Bedingungen repräsentiert dies 25 % des gesamten Eisens im Körper. Außerdem wird Ferritin in vielen Isomeren gefunden (5). Hohe Ferritinkonzentrationen werden im Zytoplasma des retikuloendothelialen Systems, in der Leber, der Milz und im Knochenmark gefunden (6). Frühere Methoden zur Messung von Eisen in diesen Geweben sind invasiv, traumatisieren den Patienten und haben keine ausreichende Sensitivität (7). Die Messung von Ferritin in Serum ist nützlich für den Nachweis von Veränderungen des Körpereisenspeichers und ist nicht invasiv bei relativ geringer Patientenbelastung. Serumferritinkonzentrationen können routinemäßig gemessen werden und sind insbesondere nützlich für eine frühe Erkennung von Eisenmangelanämie bei scheinbar Gesunden (8, 9). Serumferritinmessungen sind außerdem klinisch relevant bei der Überwachung des Eisenstatus von Schwangeren, Blutspendern und Dialysepatienten. Hohe Ferritinkonzentrationen können auf eine Eisenüberladung ohne Leberschaden hinweisen, wie sie im frühen Stadium von idiopathischer Hämochromatose auftritt (10). Serumferritinkonzentrationen wurden auch verwendet für klinische Konditionen, die nicht in Beziehung zum Eisenspeicher stehen, wie Entzündungen, chronischer Lebererkrankung und malignen Erkrankungen (11).

3.0 TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der ELISA-Technik (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Anti-Ferritin-Antikörper sind an eine Festphase gebunden, und das Konjugat enthält Anti-Ferritin-Antikörper, gekoppelt an Meerrettichperoxidase. Während einer Inkubation wird das Antigen in der Probe von beiden Antikörpern gebunden, und es wird ein Sandwich-Komplex gebildet. Nach einer Inkubation wird der ungebundene Überstand aus den Kavitäten gewaschen und das Substrat zugegeben. Nach erneuter Inkubation wird die Reaktion gestoppt, und die Extinktion wird bei 450 nm gemessen.

Die entstandene Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe.

4.0 KITKOMPONENTEN

4.1 MICROPLATE (Code 15PIA)

MTPLATE

1 Mikrotiterplatte, 12 x 8 einzeln brechbare Wells, beschichtet mit monoklonalen Anti-Ferritin-Antikörpern.

Lagerung bei 2-8 °C.
Öffnen Sie die Packung mit den beschichteten Mikrotiterplatten erst, wenn sie Raumtemperatur erreicht hat, und verschließen Sie sie danach sofort wieder.

4.2 CALIBRATORS

6 Fläschchen humanes Leberferritin mit 0,01 % Gentamycin als Konservierungsstoff.

Lagerung bei 2-8 °C.

Calibrator	Symbol	Code	Konzentration*	Füllmenge
Calibrator 0	CAL0	15CAL0	0 ng/mL	3 mL
Calibrator 1	CAL1	15CAL1	5 ng/mL	1.0 mL
Calibrator 2	CAL2	15CAL2	20 ng/mL	1.0 mL
Calibrator 3	CAL3	15CAL3	100 ng/mL	1.0 mL
Calibrator 4	CAL4	15CAL4	400 ng/mL	1.0 mL
Calibrator 5	CAL5	15CAL5	1000 ng/mL	1.0 mL

* annähernde Konzentration.

Die Kalibratoren sind gegen den 1. IS 80/602 für humanes Leberferritin standardisiert.

4.3 CONJUGATE (Code 15HRP)

CONJ|HRP

Konjugat; 1 Fläschchen (13 ml) enthält monoklonale Anti-Ferritin-Antikörper, gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase (HRP).

Gebrauchsfertig.

Lagerung bei 2-8°C.

4.4 SUBSTRATE HS (LS.TMB-H202.HK)

SUBS|TMB

Substrat; das Fläschchen enthält 13 ml einer stabilisierten Mischung aus 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂).

Gebrauchsfertig

Lagerung bei 2-8°C.

4.5 STOP SOLUTION (LS.STOP.K)

SOLN|STOP

Stopplösung; 1 Fläschchen (13 ml) O,3 M H₂SO₄

Gebrauchsfertig

Lagerung bei 2-8°C

Das Sicherheitsdatenblatt (MSDS) ist auf Anfrage erhältlich.

4.6 WASH BUFFER 20X (Cod. TLAVD)

WASH|BUF|20X

Waschpufferkonzentrat; 1 Flasche (50 ml) mit konzentriertem Waschpuffer, enthält 50mM Phosphatpuffer, pH 7,4 und Tween20 1g/l.

Zubereitung der Waschpuffer-Gebrauchslösung: Verdünnen Sie den Inhalt des Waschpufferkonzentrates (50 ml) mit destilliertem Wasser auf 1000 ml.

Lagerung bei Raumtemperatur (20-27°C) bis zum auf der Packung angegebenen Verfallsdatum

5.0 LAGERUNG NACH DEM ERSTEN ÖFFNEN

- Die Kitkomponenten sollten geschützt gegen Sonnenlicht bei 2-8 °C gelagert werden.

6.0 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- Destilliertes Wasser
- Multipipetten.
- Mikrotiterplatten-Reader für die Messung von ODs bei 450, 405 und 620 nm
- Präzisionspipetten: 0,02 und 0,1 ml
- Einmal-Pipettenspitzen
- Saugfähiges Papier
- Millimeterpapier
- Kontrollseren

7.0 HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

7.1 SICHERHEITSHINWEISE

- Alle Reagenzien dieses Kits sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Nur zur Verwendung durch Fachpersonal und entsprechend der GLP („Gute Laborpraxis“)
- Tragen Sie Einweg-Handschuhe und Schutzkleidung während des Umgangs mit Proben oder Produkten auf Serumbasis.
- Die Reagenzien enthalten Proclin 300^R und Gentamycin als Konservierungsstoffe.
- Vermeiden Sie Kontakt mit Reagenzien die Wasserstoffperoxid, Schwefelsäure oder Konservierungsstoffe enthalten, die bei Verschlucken toxisch sein können. Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Die Kalibratoren enthalten Humanserum. Sie wurden von der FDA als nichtreaktiv für HbsAg und Anti-HIV-Antikörper befunden, sollten aber trotzdem als potentiell infektiös betrachtet werden
- Beachten Sie bei der Abfallentsorgung alle lokalen und nationalen Gesetze und Vorschriften.

7.2 TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- Achten Sie auf höchste Präzision bei der Verdünnung und beim Pipettieren der Reagenzien.
- Verwenden Sie keine Reagenzien verschiedener Lots.
- Die Arbeitsanleitung ist genau zu beachten; eine sorgfältige Arbeitstechnik ist für korrekte Ergebnisse erforderlich. Eine Änderung der Testdurchführung kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Waschvorgang ist sehr wichtig. Unzureichendes Waschen führt zu schlechter Präzision und falsch erhöhter Extinktionsmessung.

8.0 PROBENGWINNUNG UND -LAGERUNG

Sie können in diesen Assay Serum- oder Plasmaproben einsetzen. Wenn Sie die Proben nicht innerhalb von 5 Tagen nach der Entnahme einsetzen, lagern Sie sie bei -20 °C.

9.0 TESTDURCHFÜHRUNG

9.1 VORBEREITUNG DES TESTANSATZES

- Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen und sorgfältig mischen.
- Alle Reagenzien sollten vor der Testdurchführung vorsichtig durch Umdrehen über Kopf oder durch Schütteln gemischt werden. Vermeiden Sie Schaumbildung.
- Da eine Messung in Doppelbestimmung erforderlich ist, sollten zwei Wells für jeden Punkt der Standardkurve (Calibrators 0-5), zwei für jede Probe und ein Well für das Blank vorbereitet werden.

9.2 PIPETTIER- UND INKUBATIONSSCHRITTE

- 20 µl der Kalibratoren, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung in die entsprechenden Kavitäten pipettieren. Lassen Sie ein Well für das Blank frei.
- 100 µl Konjugat in die Wells für Kalibratoren und Proben pipettieren (nicht in das Blank).
- 60 Minuten bei Raumtemperatur (22-28 °C) inkubieren lassen.
- Dekantieren Sie den Inhalt der Wells durch Umdrehen der Platte und 3-4-maliges festes Aufklopfen auf Absorptionpapier, um die Flüssigkeit und Luftblasen gründlich zu entfernen. Füllen Sie die Wells 2-mal mit 0,3 ml verdünntem Waschpuffer. Dekantieren Sie jeweils den Inhalt der Kavitäten durch Umdrehen der Platte und 3-4-maliges festes Aufklopfen auf Absorptionpapier.
- 100 µl EIAGEN Substrat HS in alle Kavitäten pipettieren.
- 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
- Pipettieren Sie 100 µl EIAGEN Stopplösung in alle Kavitäten.
- Messen Sie die Extinktion innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung auf einem Photometer für Mikrotiterplatten bei 450 und 405 nm bei einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Falls dies automatisch möglich ist, führen Sie einen Leerwertabgleich des Photometers durch.

10.0 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

10.1 QUALITÄTSKONTROLLE

Eine gute Laborpraxis erfordert es, dass alle Kontrollen (niedrig, mittel und hoch) eingesetzt werden. Führen Sie die Qualitätskontrolle entsprechend der geltenden Richtlinien und Gesetze durch.

10.2 OD CONVERSION

Optische Dichten über 2,0 liegen außerhalb des Messbereichs einiger Mikrotiterplatten-Reader. Daher ist es notwendig, für ODs > 2,0 eine Messung bei 405 nm (Peak-Schulter) zusätzlich zur Messung bei 450 nm (Peak-Wellenlänge) und bei 620 nm (Referenzfilter für die Subtraktion von Störungen durch das Plastik) durchzuführen.

Für Mikrotiterplatten-Reader, die nicht bei 3 Wellenlängen gleichzeitig messen können, sollte man folgendermaßen vorgehen:

- Messen Sie die Mikrotiterplatte bei 450 nm und 620 nm.

- Messen Sie erneut bei 405 nm und 620 nm.

- Suchen Sie die Wells mit ODs höher als 2,0 bei 450 nm heraus.

- Multiplizieren Sie die ODs dieser Wells, die bei 405 nm gemessen wurden, mit dem Umrechnungsfaktor 3,0:

$$OD_{450} \text{ nm} = OD_{405} \text{ nm} \times 3,0$$

Warnhinweis: Der Umrechnungsfaktor 3,0 ist nur ein Vorschlag. Für eine optimale Richtigkeit sollte der Benutzer seinen eigenen gerätespezifischen Umrechnungsfaktor berechnen.

10.3 DATENAUSWERTUNG

Automatisierte Methode

Subtrahieren Sie die OD der Blank von den ODs der Kalibratoren und Proben.

Verwenden Sie (vorzugsweise) die 4-Parameterlogistik oder Kubik-Spline für die Kurvenglättung als Kalkulationsalgorithmus

Manuelle Methode

Subtrahieren Sie die OD der Blank von den OD-Mittelwerten der Kalibratoren und Proben.

Tragen Sie die ODs der Kalibratoren auf einer logarithmischen y-Achse gegen die Konzentrationen auf einer logarithmischen y-Achse auf. Die Konzentrationen für die Patientenproben können aus dieser Kurve abgelesen werden.

10.4 MESSBEREICH

Die vorliegende Methode ermöglicht die Bestimmung von Ferritin in einem Konzentrationsbereich von 5 bis 1000 ng/ml. Verwenden Sie den Nullkalibrator für die Verdünnung von Proben mit einer Konzentration > 1000 ng/ml.

11.0 ZU ERWARTENDE WERTE

Nach Möglichkeit sollte jedes Laboratorium seine eigenen Referenzbereiche erstellen.

Es wurden folgende Plasma-Ferritin-Werte gefunden:

Kollektivgröße	Mittelwert (ng/ml)	Bereich (ng/ml)
Fertile Frauen: 50	53	6 - 180
Frauen in der Postmenopause: 30	105	8 - 350
Männer: 50	175	20 - 400

12.0 GRENZEN DES VERFAHRENS

- Bis zu einer Konzentration von 50000 ng/ml Ferritin wurde mit der vorliegenden Methode kein Hook-Effekt beobachtet.
- Es wurden keine Interferenzen mit Rheumafaktoren, Bilirubin, Hämoglobin, Cholesterin und Triglyzeriden bei der vorliegenden Methode beobachtet.
- Zur Erstellung der Diagnose sollte die Bestimmung von Ferritin immer nur in Verbindung mit anderen Laborwerten und klinischen Informationen verwendet werden.

13.0 TESTCHARAKTERISTIKA

13.1 PRÄZISION

a) Intraassay-Präzision.

Die Intraassay-Präzision wurde durch mehrfache Bestimmung von drei verschiedenen Kontrollseren in einem Testansatz ermittelt.

Serumproben	1	2	3
Anzahl der Replikate	16	16	16
Ferritin-Mittelwert (ng/ml)	15.6	76.1	160.2
Standardabweichung	0.84	2.8	5.2
% CV	5.4	3.7	3.24

b) Interassay-Präzision.

Die Interassay-Präzision wurde mit drei verschiedenen Kontrollseren in zwei Testansätzen ermittelt.

Serumproben	1	2	3
Anzahl der Replikate	16	16	16
Ferritin-Mittelwert (ng/ml)	15.4	78.2	165.2
Standardabweichung	0.88	3.6	6.93
CV%	5.7	4.6	4.2

13.2 WIEDERFINDUNG

Drei Patientenseren wurden bekannte Mengen von Ferritin in steigender Konzentration zugefügt.

Die mittlere Wiederfindung im Vergleich zu vorherigen Konzentration lag bei 98.0 %.

	Erwartete Konzentration (ng/ml)	Gemessene Konzentration (ng/ml)	Wiederfindung %
PROBE 1			
Ausgangskonz.: 18			
50 ng/ml	68.0	65.0	95.6
100 ng/ml	118	122	103.4
200 ng/ml	218	210	96.3
PROBE 2			
Ausgangskonz.: 128			
50 ng/ml	178	169	94.9
100 ng/ml	228	234	102.6
200 ng/ml	328	317	96.6
PROBE 3			
Ausgangskonz.: 8.7			
12.5 ng/ml	21.2	22.4	106.2
25 ng/ml	33.7	31.8	94.4
50 ng/ml	58.7	56.4	96.1
100 ng/ml	108.7	105.9	97.4

13.3 LINEARITÄT - VERDÜNNUNG

Zwei Patientenproben wurden seriell mit Nullstandard verdünnt. Die mittlere Wiederfindung lag bei 103, 5 %.

	Erwartete Konzentration (ng/ml)	Gemessene Konzentration (ng/ml)	Wiederfindung%
Probe 1			
Verdünnung			
Unverdünnt		86	
1:2	43.0	45.1	105.4
1:4	21.5	22.1	102.8
1:8	10.75	12.4	107.9
Probe 2			
Verdünnung			
Unverdünnt		128	
1:2	64	65	101.6
1:4	32	30.4	93.7
1:8	16	17.1	106.1

13.1 METHODENVERGLEICH

Der EI-Agen Ferritin-Assay (y) wurde mit einem kommerziellen RIA (x) verglichen:

$$Y = 2,8 + 1,06X \\ r=0,99$$

13.1 SENSITIVITÄT

Die untere Nachweisgrenze dieses Assays für humanes Ferritin liegt bei ca. 1,0 ng/ml.

13.1 SPEZIFITÄT

Folgende Materialien wurden auf ihre Kreuzreaktion im EI-Agen Ferritin-Assay getestet (Berechnung nach Abraham):

Iso Leber-Ferritin	100.0 %
Iso Milz-Ferritin	80.0 %
Iso Herz Ferritin	12.0 %

14.0 AUTOMATISIERUNG

Testprotokolle für die Automatisierung auf Mikrotiterplatten-Analysengeräten von Adaltis (Labotech, PersonalLAB und Nexgen) sind auf Anfrage direkt bei Adaltis erhältlich.

15.0 "TROUBLESHOOTING" (PROBLEMLÖSUNGEN)

Wenn Sie sowohl die Angaben in der Gebrauchsanweisungen für die Testdurchführung und deren Spezifikationen beachten, als auch sorgfältig mit den Reagenzien umgehen und pipettieren, können Sie die folgende Fehler vermeiden.

Problem	Mögliche Ursachen/Lösungsvorschläge
ODs weichen stark ($\pm 50\%$) von den im QC-Zertifikat angegebenen ab	<ul style="list-style-type: none"> - falsches Pipettiervolumen für Reagenzien (Vorschlag: Vergleichen Sie das pipettierte Volumen mit dem für den Assay benötigten; rekalisieren Sie die Pipetten) - falsche Temperatur oder Inkubationszeit (Vorschlag: mehr Sorgfalt bei der Wartung des Inkubators; notieren Sie den Beginn der Inkubation) - Fehler beim Waschen oder bei der Photometermessung (Vorschlag: Überprüfen Sie die Funktion und Einstellungen des entsprechenden Gerätes) - Kontamination des Substrates (Vorschlag: Verwenden Sie nur saubere Einweg-Plastikbehälter)
Geringe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	<ul style="list-style-type: none"> - Verunreinigung oder vorzeitiger Verfall von Reagenzien (Vorschlag: Verwenden Sie geeignete Spitzen, saubere Einweg-Plastikbehälter für die Reagenzien und destilliertes Wasser von guter Qualität)
Keine Farbentwicklung nach Zugabe des Substrates	<ul style="list-style-type: none"> - Reagenz nicht pipettiert - starke Kontamination des Konjugates oder Substrates - Fehler bei der Testdurchführung (z.B. versehentliches Pipettieren der Reagenzien in falscher Reihenfolge oder aus einem falschen Fläschchen etc.)
Zu geringe Reaktion (zu niedrige ODs)	<ul style="list-style-type: none"> - falsches Konjugat (z.B. aus einem anderen Kit) - versehentliche Kontamination/vorzeitiger Verfall des Konjugates
Zu starke Reaktion (zu hohe ODs)	<ul style="list-style-type: none"> - Inkubationszeit zu lang, Inkubationstemperatur zu hoch - Wasserqualität für den Waschpuffer nicht ausreichend (niedriger Grad an Deionisation) - ungeeignetes Waschen (Konjugat nicht gründlich entfernt)
Nicht erklärbare Ausreißer	<ul style="list-style-type: none"> - Kontamination von Pipetten, Spitzen oder Behältern - ungeeignetes Waschen (Konjugat nicht gründlich entfernt)
Zu hohe Intraassay % CV	<ul style="list-style-type: none"> - Reagenzien und/oder Streifen nicht vor Gebrauch auf Raumtemperatur vorgewärmt. - Plattenwäscher wäscht nicht korrekt (Vorschlag: Waschkopf reinigen)
Zu hohe Interassay % CV	<ul style="list-style-type: none"> - Inkubationsbedingungen nicht konstant (Zeit, Temperatur) - Kontrollen und Proben nicht zu selben Zeit pipettiert (im selben Zeitabstand) - Prüfen Sie die Pipettierreihenfolge) - personenabhängige Variation

16. LITERATUR

1. Fairbanks VF, Bentler E. Hematology. Williams, Bentler, Erslev, Rundles, editors. New York: McGraw Hill; 1972. p 305-26.
2. Colltrell DB. Lab Mgmt 1978 Feb.
3. Jacobs A, Worwood M. Prog Hematol 1975;9:1.
4. Forman DT, Vye MV. Clin Chem 1980;26(1):145-47.
5. Hazard JT, Yokota M, Arosio P, Drysdale J. Blood 1977;49(139).
6. Baur JD, Gradwohl's. Clin Meth and Diag 1970;22(1):436.
7. Jacobs A. Fed Proc 1977;36(7).
8. Schrier S. Hematology. In: Rubenstein E, Federman D, editors. Scientific American. New York: Scientific American Inc.; 1980. Chapter V.
9. White D, Kramer D, Johnson G, Dick F, Hamilton H. A J C P 1986 Feb.
10. Valberg L. CMA J 1980;122:1240.
11. Forman D, Parker S. Ann Clin Lab Sci 1980;10:345.
12. Engvall E. Methods in Enzymology. VanVunakis H, Langone JJ, editors. New York: Academic Press; 1980. Volume 70; p 419-92.
13. Uotila M, Ruoslahti E, Engvall E. J Immunol Methods 1981;42:11-15.
14. Simes MA, Addiego Jr JE, Dallman PR. Blood 1974;43:581.
15. Walter G.O., Miller F.W., Wer wood, M. J. Clin. Path. 29 770 - 772 (1973)
16. Watanabe, N. Niitsu, Y. Ohtsuka, S. Kosaki, J. Kohgo, Y. Urushisaki, I. Kato, K. Ishikawa, E. Clin. Chem., 25/1, 80 - 82 (1979).
17. Van Oost, S.A. Willekens, F.L.A., B.R. Van Neebors, B.R., Van Den Beld, B. Clin. Chem., 28/12, 2429 - 2433 (1982).
18. Ronald H, Ng. Brown, A.B. Valdes JR. Clin. Chem 29/6, 1109 - 1113 (1983)

EIAgen Ferritin KIT

REF LI4023

Σ 96 εξετάσεις

Adaltis Italia S.p.A.

Via Cristoni, 12
40033 Casalecchio di Reno – (BO) Italy
Τηλ. +39-051-6136511 – Φαξ +39-051-575280
www.adaltis.com








ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ ΜΟΝΟ ΓΙΑ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ

ΧΡΗΣΗ

Φυλάσσεται στους 2..8 °C



ΣΥΜΒΟΛΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΙΣ ΕΤΙΚΕΤΕΣ

MTPLATE	Μικροπλάκα
CONJ HRP	Σύζευγμα
CAL0	Διάλυμα Βαθμονόμησης 0
CAL1	Διάλυμα Βαθμονόμησης 1
CAL2	Διάλυμα Βαθμονόμησης 2
CAL3	Διάλυμα Βαθμονόμησης 3
CAL4	Διάλυμα Βαθμονόμησης 4
CAL5	Διάλυμα Βαθμονόμησης 5
SUBS TMB	Υπόστρωμα HS (TMB)
SOLN STOP	Διάλυμα Παύσης
WASH BUF 20X	Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης 20X
LOT	Αριθμός παρτίδας
REF	Κωδικός καταλόγου
	Ημερομηνία λήξης (χρήση έως ...)
	Θερμοκρασιακά όρια (φυλάσσεται στους 2..8°C)
	Αριθμός εξετάσεων
	Διατηρείτε μακριά από την ηλιακή ακτινοβολία
	Κατασκευάζεται από
	Προσοχή, Βλ. Οδηγίες Χρήσεως
IVD	In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή (Διαγνωστική χρήση in vitro)
	Βιολογικός κίνδυνος (βλ. ενότητα 7 ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ).

1.0 ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το kit EIAgen Ferritin είναι μια χρωμομετρική ανοσοενζυμική μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της Φερριτίνης στον ανθρώπινο ορό και το πλάσμα.

2.0 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΤΑΣΕΩΣ

Μια από τις πιο διαδεδομένες διαταραχές του ανθρώπου είναι η διατροφική ανεπάρκεια του σιδήρου και η προκύπτουσα αναιμία (1). Οι αναλύσεις για το σίδηρο, την ολική ικανότητα δέσμευσης του σιδήρου και άλλες αξιολογήσεις για τις ενώσεις του σιδήρου στο σώμα είναι κλινικά σημαντικές (2). Στις σιδηρο-αποθηκευτικές ενώσεις στο σώμα περιλαμβάνονται η αιμοσφαιρίνη, η αιμοσιδηρίνη, η μυοσφαιρίνη και τα κυτοχρώματα. Στους περισσότερους ιστούς, η Φερριτίνη είναι η κύρια σιδηρο-αποθηκευτική πρωτεΐνη (3). Η ανθρώπινη Φερριτίνη έχει μοριακό βάρος περίπου 450.000 και αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό περίβλημα γύρω από ένα πυρήνα σιδήρου. Κάθε μόριο Φερριτίνης ενδέχεται να περιέχει έως και 4.000 άτομα σιδήρου (4). Υπό φυσιολογικές συνθήκες αυτό μπορεί να αντιπροσωπεύει έως και το 25% του συνολικού σιδήρου που υπάρχει στο σώμα. Επιπλέον, η Φερριτίνη απαντάται σε πολλά ισομερή (5). Υψηλές συγκεντρώσεις της Φερριτίνης απαντώνται στο κυτταρόπλασμα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, στο ήπαρ, το σπλήνα και το μυελό των οστών (6). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνταν στο παρελθόν για να μετρούν το σίδηρο σε αυτούς τους ιστούς ήταν επεμβατικές, τραυματίζοντας τον ασθενή και χωρίς να έχουν επαρκή ευαισθησία (7). Η μέτρηση της Φερριτίνης στον ορό χρησιμεύει για τον προσδιορισμό των μεταβολών στην αποθήκευση του σιδήρου στο σώμα, ενώ είναι μη επεμβατική και με μια σχετικά μικρή ενόχληση του ασθενούς. Τα επίπεδα της Φερριτίνης του ορού μπορούν να μετρούνται σε καθημερινή βάση και είναι ιδιαίτερα χρήσιμα για τον πρώιμο εντοπισμό της σιδηροπενικής αναιμίας σε φαινομενικά υγιή άτομα (8, 9). Οι μετρήσεις της Φερριτίνης του ορού έχουν κλινική σημασία για την παρακολούθηση της κατάστασης του σιδήρου στις εγκύους, τους αιμοδότες και τους ασθενείς νεφρικής αιμοκάθαρσης. Τα υψηλά επίπεδα Φερριτίνης μπορεί να αποτελούν ένδειξη για μεγάλα φορτία σιδήρου χωρίς όμως εμφανή ηπατική βλάβη, όπως μπορεί να παρατηρηθεί κατά τα πρώιμα στάδια της ιδιοπαθούς αιμοχρωμάτωσης (10). Τα επίπεδα της Φερριτίνης στον ορό έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης για την αξιολόγηση κλινικών συνθηκών που δε σχετίζονται με την αποθήκευση του σιδήρου, περιλαμβανομένων των φλεγμονών, της χρόνιας ηπατικής νόσου και των κακοηθειών (11).

3.0 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ

Το kit EIAgen Ferritin βασίζεται στην ταυτόχρονη δέσμευση της ανθρώπινης Φερριτίνης σε δύο μονοκλωνικά αντισώματα: το ένα ακινητοποιημένο σε πλάκες μικροφρεατίων και το άλλο συζευγμένο με υπεροξειδάση χρένου (HRP).

Μετά την επώαση ο διαχωρισμός του δεσμευμένου/ελεύθερου πραγματοποιείται με ένα απλό πλύσιμο στερεάς φάσης. Το ένζυμο στο δεσμευμένο κλάσμα αντιδρά με το Υπόστρωμα (TMB) αναπτύσσοντας ένα μπλε χρώμα που αλλάζει σε κίτρινο με την προσθήκη του διαλύματος Παύσης (H₂SO₄).

Η συγκέντρωση Φερριτίνης στο δείγμα υπολογίζεται με βάση μια σειρά βαθμονομητών.

Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση Φερριτίνης στο δείγμα.

4.0 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΙΤ

4.1 ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑ (κωδικός 15PIA)

MTPLATE

1 μικροπλάκα με 12 x 8 διαστάσιμα φρεάτια επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα αντι-Φερριτίνης.

Φυλάσσεται στους 2-8°C.

4.2 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ

6 φιαλίδια που περιέχουν Φερριτίνη ανθρώπινου ήπατος με γενταμικίνη ως συντηρητικό, συγκεντρώσεως 0,01%.

Ανοίξτε τη συσκευασία των επικαλυμμένων μικροπλακών μόνον όταν αποκτήσει τη θερμοκρασία περιβάλλοντος και κλείστε τη αμέσως μετά τη χρήση.

Φυλάσσεται στους 2-8°C.

Διάλυμα Βαθμονόμησης	Σύμβολο	Κωδικός	Συγκέντρωση*	Όγκος
Διάλυμα Βαθμονόμησης 0	CAL0	15CAL0	0 ng/mL	3 mL
Διάλυμα Βαθμονόμησης 1	CAL1	15CAL1	5 ng/mL	1.0 mL
Διάλυμα Βαθμονόμησης 2	CAL2	15CAL2	20 ng/mL	1.0 mL
Διάλυμα Βαθμονόμησης 3	CAL3	15CAL3	100 ng/mL	1.0 mL
Διάλυμα Βαθμονόμησης 4	CAL4	15CAL4	400 ng/mL	1.0 mL
Διάλυμα Βαθμονόμησης 5	CAL5	15CAL5	1000 ng/mL	1.0 mL

* συγκέντρωση κατά προσέγγιση.

Οι βαθμονομητές έχουν βαθμονομηθεί κατά το 1st IS Ferritin Human Liver 80/602 του ΠΟΥ.

4.3 ΣΥΖΕΥΓΜΑ (κωδικός 15HRP)

CONJ|HRP

1 φιαλίδιο που περιέχει 13 ml μονοκλωνικού αντισώματος αντι-Φερριτίνης, συζευγμένο με υπεροξειδάση χρένου (HRP).

Έτοιμο προς χρήση.

Φυλάσσεται στους 2-8°C.

4.4 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ HS (LS.TMB-H2O2.HK)

SUBS|TMB

1 φιαλίδιο που περιέχει 13 ml από ένα σταθεροποιημένο μείγμα του TMB 0,25g/l (3,3',5,5'-Τετραμεθυλβενζιδίνη) και του H₂O₂ (υπεροξειδίου του υδρογόνου).

Έτοιμο προς χρήση.

Φυλάσσεται στους 2-8°C.

4.5 ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΑΥΣΗΣ (LS.STOP.K)

SOLN|STOP

1 φιαλίδιο που περιέχει 13 ml H₂SO₄ 0,3 M.

Έτοιμο προς χρήση.

Φυλάσσεται στους 2-8°C.

Το MSDS διατίθεται κατόπιν αιτήσεως του προσωπικού του εργαστηρίου

4.6 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΛΥΣΗΣ 20X (κωδ. TLAVD)

WASH|BUF|20X

1 φιάλη που περιέχει 50 ml πυκνού ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50mM pH 7,4 και Tween20 1g/l.

Προετοιμασία του διαλύματος εργασίας για Ρυθμιστικό Διάλυμα Πλύσης: αραιώστε με απεσταγμένο νερό το περιεχόμενο του πυκνού ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης (50 ml) έως τα 1000 ml.

ΦΥΛΑΞΗ φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου (20-27°C). Παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξεως.

5.0 ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΜΕΤΑ ΤΟ ΠΡΩΤΟ ΑΝΟΙΓΜΑ

- Τα συστατικά του kit πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8°C και πρέπει να προστατεύονται από το φως του ήλιου.

6.0 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Απεσταγμένο νερό
- Αυτόματοι διανομείς.
- Συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας ικανή να μετρά τις Ο.Π. στα 450, 405 και 620 nm
- Πιπέτες ακρίβειας: 0,02 και 0,1 ml
- Αναλώσιμα ρύγχη πιπέτων
- Απορροφητικό χαρτί
- Χαρτί γραφικών παραστάσεων
- Ορός μάρτυρας

7.0 ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

7.1 ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

- Τα αντιδραστήρια ως συντηρητικά περιέχουν Proclin 300^R και Γενταμικίνη.
- Αποφύγετε την επαφή με αντιδραστήρια που περιέχουν υπεροξειδίου του υδρογόνου,θειικό οξύ και συντηρητικά τα οποία μπορεί να είναι τοξικά αν καταποθούν. Μην αναρροφάτε με το στόμα.
- Οι βαθμονομητές περιέχουν ορό ανθρώπου. Από τον FDA δεν έχει βρεθεί να αντιδρούν για HbsAg και αντισώματα anti-HIV. Ωστόσο, τα προϊόντα αυτά πρέπει να χειρίζονται ως δυνητικά επικίνδυνα.
- Ακολουθήστε όλους τους τοπικούς, πολιτειακούς και εθνικούς κανονισμούς για τη διάθεση των αποβλήτων.

7.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- Όταν αραιώνετε και διανέμετε τα αντιδραστήρια, τηρήστε όσο γίνεται τη μεγαλύτερη δυνατόν ακρίβεια.
- Μη χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια που ανήκουν σε διαφορετικές παρτίδες.
- Αξιοπίστα και επαναλήψιμα αποτελέσματα μπορούν να υπάρχουν όταν τη διαδικασία της ανάλυσης την πραγματοποιείτε έχοντας κατανοήσει πλήρως τις οδηγίες του ένθετου της συσκευασίας και με προσήλωση στη σωστή εργαστηριακή πρακτική.
- Η διαδικασία της πλύσης είναι κρίσιμη. Ανεπαρκές πλύσιμο έχει ως αποτέλεσμα ανεπαρκή ακρίβεια και εσφαλμένως αυξημένες ενδείξεις απορρόφησης.

8.0 ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Ο προσδιορισμός της Φερριτίνης μπορεί να έρθει εις πέρας είτε σε πλάσμα είτε σε ορό. Αν η διανομή δεν πραγματοποιηθεί εντός πέντε ημερών από τη συγκέντρωση, φυλάξτε το δείγμα στους -20°C.

9.0 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

9.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ

- Προτού χρησιμοποιήσετε οποιοδήποτε αντιδραστήριο αφήστε το να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου (18-25 °C).
- Όλα τα αντιδραστήρια πριν τη χρήση πρέπει να αναμιγνύονται με ήπια ανακίνηση ή περιστροφή. Μη δημιουργείτε αφρό.
- Από τη στιγμή που η ανάλυση είναι απαραίτητη να γίνει εις διπλούν, πρέπει για κάθε σημείο της τυπικής καμπύλης (Βαθμονομητές 0-5) να προετοιμαστούν δύο φρεάτια, δύο φρεάτια για κάθε Δείγμα και ένα για το τυφλό.

9.2 ΔΙΑΝΟΜΗ ΜΕ ΠΙΠΕΤΕΣ ΚΑΙ ΒΗΜΑΤΑ ΕΠΩΑΣΗΣ

- A. Διανέμετε** 20 ml έκαστου βαθμονομητή και δείγματος εις διπλούν, αφήνοντας ένα φρεάτιο άδειο για το τυφλό.
- B. Διανέμετε** 100 ml του συζεύγματος μέσα στα φρεάτια των βαθμονομητών και του δείγματος. Μην προσθέτετε σύζευγμα μέσα στο φρεάτιο του τυφλού.
- C. Επλώστε** για 1 h στους +22-28°C (θερμοκρασία δωματίου).
- D. Αφαιρέστε** το μείγμα των αντιδραστηρίων, μετά **πλύνετε** κάθε φρεάτιο χορηγώντας 0,3 ml αραιωμένου ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης. Πλύνετε δύο φορές ώστε να αφαιρέσετε πλήρως το υγρό.
- E. Διανέμετε:** 100 ml Υποστρώματος σε κάθε φρεάτιο.
- F. Επλώστε** 10 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου (22-28°C).
- G. Διανέμετε:** 100 ml Διαλύματος Παύσης σε κάθε φρεάτιο.
- H. Διαβάστε** την οπτική πυκνότητα, εντός 30 min στα 450 και 405 nm με το φίλτρο αναφοράς ρυθμισμένο στα 620 nm. Αν είναι εφικτό κάντε το αυτομάτως, ρυθμίζοντας τη συσκευή ανάγνωσης στο μηδέν χρησιμοποιώντας το τυφλό.

10.0 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

10.1 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η σωστή εργαστηριακή πρακτική απαιτεί να εκτελούνται όλοι οι μάρτυρες (χαμηλοί, μεσαίοι και υψηλοί). Για να καταρτίσετε τις μέσες τιμές και τα αποδεκτά όρια τιμών ώστε να διασφαλίσετε τη σωστή απόδοση, πρέπει να αναλύσετε ένα στατιστικά σημαντικό αριθμό μαρτύρων.

10.2 ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΟΠΤ. ΠΥΚΝ. (ΟΠ)

Οι οπτικές πυκνότητες (OD) ορισμένων διαλυμάτων βαθμονόμησης και δειγμάτων μπορεί να είναι υψηλότερες από 2,0 στην οποία περίπτωση μπορεί να βρίσκονται εκτός του εύρους μέτρησης της συσκευής ανάγνωσης μικροπλάκας. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητο, οι ΟΠ που είναι υψηλότερες από 2,0 να διαβάζονται στα 405 nm (= μήκος κύματος του μίμου κορυφής) μαζί με τα 450 nm (μήκος κύματος κορυφής) και 620 (φίλτρο αναφοράς για την αφαίρεση της παρεμβολής λόγω του πλαστικού).

Σε συσκευές ανάγνωσης μικροπλάκων που δεν είναι σε θέση να διαβάζουν ταυτόχρονα την πλάκα στα 3 μήκη κύματος, σας συμβουλευόμαστε να προχωρήσετε όπως παρακάτω:

- Διαβάστε τη μικροπλάκα στα 450 nm και τα 620 nm.
- Διαβάστε πάλι την πλάκα στα 405 nm και 620 nm.
- Βρείτε τα φρεάτια των οποίων οι ΟΠ στα 450 nm είναι μεγαλύτερες από 2,0
- Επιλέξτε τις αντίστοιχες ΟΠ διαβάστε στα 405 nm πολλαπλασιάστε τις τιμές αυτές στα 405 nm επί το συντελεστή μετατροπής 3,0 (όπου ΟΠ 450/ΟΠ 405 = 3,0), το οποίο είναι: $ΟΠ\ 450\ nm = ΟΠ\ 405\ nm \times 3,0$

Προειδοποίηση: Ο συντελεστής μετατροπής 3,0 απλώς προτείνεται. Για μεγαλύτερη ακρίβεια, ο χρήστης συμβουλευτεί να υπολογίσει το συντελεστή μετατροπής που είναι ειδικός για τη δική του συσκευή ανάγνωσης.

10.3 ΑΝΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ - ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Αφαιρέστε την ΟΠ του τυφλού από τις ΟΠ του βαθμονομητή και του δείγματος

Χρησιμοποιήστε τις 4 λογιστικές παραμέτρους - που προτιμούνται - ή την ομαλή λειτουργία κυβικής εξομάλυνσης ως υπολογιστικό αλγόριθμο.

10.4 ΑΝΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ - ΧΕΙΡΟΚΙΝΗΤΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

- Αφαιρέστε την ΟΠ του τυφλού από τις ΟΠ του βαθμονομητή και του δείγματος
- Υπολογίστε τη μέση ΟΠ για κάθε σημείο της τυπικής καμπύλης και κάθε δείγματος.
- Σχεδιάστε σε διλογαριθμικό χαρτί τις τιμές των βαθμονομητών της Φερριτίνης και μετά προεκτείνετε την ευθεία γραμμή.
- Διαβάστε τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις Φερριτίνης των μαρτύρων και των δειγμάτων

10.5 ΕΥΡΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ

Η παρούσα μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων Φερριτίνης από 5 ng/ml έως 1.000 ng/ml. Για να αραιώσετε δείγματα που έχουν συγκεντρώσεις > 1.000 ng/ml χρησιμοποιήστε το βαθμονομητή μηδέν.

11.0 ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Κάθε εργαστήριο πρέπει να καταρτίσει το δικό του εύρος τιμών με βάση τον πληθυσμό των ασθενών.

Οι τιμές Φερριτίνης στο πλάσμα περιλαμβάνονται στα παρακάτω εύρη τιμών:

Αριθμός ασθενών	Μέση τιμή (ng/mL)	Εύρος (ng/mL)	τιμών
Γυναίκες σε γόνιμη περίοδο:50	53	6 - 180	
Γυναίκες σε μετα-εμμηνόπαυση: 30	105	8 - 350	
Άνδρες 50	175	20 - 400	

12.0 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

- Με την παρούσα μέθοδο δεν παρατηρήθηκε κανένα "hook effect" έως τα 50.000 ng/ml Φερριτίνης.
- Με την παρούσα μέθοδο δεν παρατηρήθηκε καμία παρεμβολή από τους ρευματοειδείς παράγοντες, τη χολερυθρίνη, την αιμοσφαιρίνη, τη χοληστερίνη, τα τριγλυκερίδια.
- Για διαγνωστικούς σκοπούς τα αποτελέσματα που πάρθηκαν με την εξέταση αυτή πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο ως πρόσθετο στοιχείο μαζί με άλλα δεδομένα (πχ. συμπτώματα, αποτελέσματα άλλων εξετάσεων, κλινικές εντυπώσεις) που διατίθενται στον ιατρό.

13.0 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

13.1 ΑΚΡΙΒΕΙΑ

α) Ακρίβεια εντός του ίδιου κύκλου.

Η ακρίβεια εντός του ίδιου κύκλου αξιολογήθηκε με επαναλαμβανόμενους προσδιορισμούς σε τρεις διαφορετικούς ορούς μάρτυρες που αναλύθηκαν σε μια ανάλυση. Η διακύμανση εντός του ίδιου κύκλου αναφέρεται παρακάτω:

Δείγμα ορού	1	2	3
Αριθμός επαναλήψεων	16	16	16
Μέση τιμή Φερριτίνης (ng/mL)	15.6	76.1	160.2
Τυπική Απόκλιση	0.84	2.8	5.2
%CV	5.4	3.7	3.24

β) Ακρίβεια μεταξύ κύκλων.

Η ακρίβεια μεταξύ κύκλων αξιολογήθηκε με τρεις διαφορετικούς ορούς μάρτυρες που αναλύθηκαν σε δύο διαφορετικές αναλύσεις. Η διακύμανση μεταξύ των κύκλων αναφέρεται παρακάτω:

Δείγμα ορού	1	2	3
Αριθμός επαναλήψεων	16	16	16
Μέση τιμή Φερριτίνης (ng/mL)	15.4	78.2	165.2
Τυπική Απόκλιση	0.88	3.6	6.93
CV%	5.7	4.6	4.2

13.2 ΑΝΑΚΤΗΣΗ

Σε δύο ασθενείς δόθηκαν γνωστές ποσότητες Φερριτίνης, αυξανόμενης ποσότητας. Η μέση τιμή ανάκτησης σε σύγκριση προς τις προηγούμενες συγκεντρώσεις ήταν 98,0 %.

	Αναμενόμενη Συγκέντρωση (ng/ml)	Παρατηρούμενη Συγκέντρωση (ng/ml)	Ανάκτηση %
Δείγμα 1			
Προστιθέμενη Π.: 18			
50 ng/ml	68.0	65.0	95.6
100 ng/ml	118	122	103.4
200 ng/ml	218	210	96.3
Δείγμα 2			
Προστιθέμενη Π.: 128			
50 ng/ml	178	169	94.9
100 ng/ml	228	234	102.6
200 ng/ml	328	317	96.6
Δείγμα 3			
Προστιθέμενη Π.: 8.7			
12.5 ng/ml	21.2	22.4	106.2
25 ng/ml	33.7	31.8	94.4
50 ng/ml	58.7	56.4	96.1
100 ng/ml	108.7	105.9	97.4

13.3 ΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ

Για τη μελέτη γραμμικότητας, δύο δείγματα ασθενών αραιώθηκαν κατά σειρά με το βαθμονομητή μηδέν. Η μέση τιμή ανάκτησης ήταν 103,5 %.

	Αναμενόμενη Συγκέντρωση (ng/mL)	Παρατηρούμενη Συγκέντρωση (ng/mL)	Αναμενόμενη η %
Δείγμα 1			
Αραίωση			
Μη αραιωμένο		86	
1:2	43.0	45.1	105.4
1:4	21.5	22.1	102.8
1:8	10.75	12.4	107.9
Δείγμα 2			
Αραίωση			
Μη αραιωμένο		128	
1:2	64	65	101.6
1:4	32	30.4	93.7
1:8	16	17.1	106.1

13.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το kit EIAgen Ferritin (y) συγκρίθηκε με μια άλλη εμπορική μέθοδο RIA (x).

$$Y = 2,8 + 1,06X \\ r=0,99$$

13.5 ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση της Ανθρώπινης Φερριτίνης από την ανάλυση αυτή υπολογίζεται ότι είναι 1,0 ng/mL.

13.6 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα των αντισωμάτων, όπως υπολογίζεται στο 50% σύμφωνα με τον Abraham, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Iso Φερριτίνη Ήπατος	100.0 %
Iso Φερριτίνη Σπληνός	80.0 %
Iso Φερριτίνη Καρδιάς	12.0 %

14.0 ΑΥΤΟΜΑΤΙΣΜΟΣ

Τα πρωτοκόλλα εφαρμογής για το σωστό αυτοματισμό στους αναλυτές ταινιών μικροτίλων Adaltis (Labotech, Personal Lab και Nexgen) διατίθενται μετά από απευθείας παραγγελία στην Adaltis.

15.0 ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

Η προσκόλληση στη διαδικασία και τις προδιαγραφές της δοκιμασίας, όπως επίσης η σωστή χρήση των αντιδραστηρίων και η κατάλληλη διανομή με τις πιπέτες, ίσως βοηθήσουν στην αποφυγή των παρακάτω ειδών σφαλμάτων:

ΣΦΑΛΜΑ	ΠΙΘΑΝΑ ΑΙΤΙΑ/ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ
Η ΟΠ είναι πολύ διαφορετική (± 50%) από την ΟΠ που αναφέρεται στο QC	- διανομή λανθασμένων όγκων αντιδραστηρίων (σύσταση: ελέγξτε την αντιστοιχία μεταξύ του χορηγούμενου από την πιπέτα όγκου και αυτού που απαιτεί η δοκιμασία. Βαθμονομήστε εκ νέου τις πιπέτες). - λανθασμένη θερμοκρασία ή λανθασμένος χρόνος επώασης (σύσταση: περισσότερη προσοχή στη συντήρηση του επωαστήρα. Σημειώστε το χρόνο έναρξης της επώασης) - σφάλμα στο πλύσιμο ή τη μέτρηση του φασματοφωτόμετρου (σύσταση: ελέγξτε τη λειτουργία ή τις ρυθμίσεις των αντίστοιχων οργάνων) - μόλυνση του Υποστρώματος ή του Συζεύγματος (σύσταση: χρησιμοποιείτε μόνο καθαρά, πλαστικά δοχεία μιας χρήσης)
Χαμηλή επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων	- μη σταθερή διανομή όγκων του δείγματος ή των αντιδραστηρίων (σύσταση: ελέγξτε την ακρίβεια των πιπέτων και την αντιστοιχία μεταξύ του χορηγούμενου από την πιπέτα όγκου και αυτού που απαιτεί η δοκιμασία. Βαθμονομήστε εκ νέου τις πιπέτες) - σφάλμα στο πλύσιμο ή τη μέτρηση (σύσταση: ελέγξτε τη λειτουργία ή τις ρυθμίσεις των αντίστοιχων οργάνων) - μόλυνση του Υποστρώματος (σύσταση: χρησιμοποιείτε μόνο καθαρά, πλαστικά δοχεία μιας χρήσης) - μόλυνση ή αποικοδόμηση των αντιδραστηρίων (σύσταση: για τα αντιδραστήρια χρησιμοποιείτε κατάλληλα ακροφύσια, καθαρά πλαστικά δοχεία μιας χρήσης και υψηλής ποιότητας ή άλλο ισοδύναμο νερό)
χωρίς χρωμομετρική αντίδραση μετά την προσθήκη του υποστρώματος	- κάποιο αντιδραστήριο δεν χορηγήθηκε - υψηλή μόλυνση του Συζεύγματος ή του Υποστρώματος - σφάλματα στην επιτέλεση της διαδικασίας της δοκιμασίας (πχ. τυχαία διανομή των αντιδραστηρίων με την πιπέτα σε λανθασμένη αλληλουχία ή από το λάθος φιαλίδιο, κλπ.)
πολύ χαμηλή αντίδραση (πολύ χαμηλές ΟΠ)	- πολύ σύντομος χρόνος επώασης, πολύ χαμηλή θερμοκρασία επώασης
πολύ υψηλή αντίδραση (πολύ υψηλές ΟΠ)	- πολύ μεγάλος χρόνος επώασης, πολύ υψηλή θερμοκρασία επώασης - ανεπαρκής ποιότητα νερού για το ρυθμιστικό δ/μα πλύσης (χαμηλός βαθμός απιονισμού) - ανεπαρκές πλύσιμο (τα συζεύγματα δεν απομακρύνθηκαν σωστά)
ανεξήγητες ακραίες τιμές	- μόλυνση πιπέτων, ακροφυσίων ή δοχείων - ασταθές και ανεπαρκές πλύσιμο (τα συζεύγματα δεν απομακρύνθηκαν σωστά)
η CV% είναι πολύ υψηλή εντός του κύκλου	- τα αντιδραστήρια ή/και οι ταινίες δεν προθερμάνθηκαν σε Θερμοκρασία Δωμ. πριν από τη χρήση - το πλυντήριο πλάκων δεν πλένει σωστά (σύσταση: καθαρίστε την κεφαλή του πλυντηρίου)
η CV% είναι πολύ υψηλή μεταξύ κύκλων	- οι συνθήκες επώασης δεν είναι σταθερές (χρόνοι, θερμοκρασία) - οι μάρτυρες και τα δείγματα δεν διανέμονται ταυτόχρονα (με τα ίδια διαστήματα) (ελέγξτε τη σειρά διανομής με την πιπέτα) - διακύμανση που σχετίζεται με τον ανθρώπινο παράγοντα

16.0 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fairbanks VF, Bentler E. Hematology. Williams, Bentler, Erslev, Rundles, editors. New York: McGraw Hill; 1972. p 305-26.
2. Colltrell DB. *Lab Mgmt* 1978 Feb.
3. Jacobs A, Worwood M. *Prog Hematol* 1975;9:1.
4. Forman DT, Vye MV. *Clin Chem* 1980;26(1):145-47.
5. Hazard JT, Yokota M, Arosio P, Drysdale J. *Blood* 1977;49(139).
6. Baur JD, Gradwohls. *Clin Meth and Diag* 1970;22(1):436.
7. Jacobs A. *Fed Proc* 1977;36(7).
8. Schrier S. Hematology. In: Rubenstein E, Federman D, editors. Scientific American. New York: Scientific American Inc.; 1980. Chapter V.
9. White D, Kramer D, Johnson G, Dick F, Hamilton H. *A J C P* 1986 Feb.
10. Valberg L. *CMA J* 1980;122:1240.
11. Forman D, Parker S. *Ann Clin Lab Sci* 1980;10:345.
12. Engvall E. *Methods in Enzymology*. VanVunakis H, Langone JJ, editors. New York: Academic Press; 1980. Volume 70; p 419-92.
13. Uotila M, Ruoslahti E, Engvall E. *J Immunol Methods* 1981;42:11-15.
14. Simes MA, Addiego Jr JE, Dallman PR. *Blood* 1974;43:581.
15. Walter G.O., Miller F.W., Wer wood, M. *J. Clin. Path.* 29 770 - 772 (1973)
16. Watanabe, N. Niitsu, Y. Ohtsuka, S. Kosaki, J. Kohgo, Y. Urushisaki, I. Kato, K. Ishikawa, E. *Clin. Chem.*, 25/1, 80 - 82 (1979).
17. Van Oost, S.A. Willekens, F.L.A., B.R. Van Neebors, B.R., Van Den Beld, B. *Clin. Chem.*, 28/12, 2429 - 2433 (1982).
18. Ronald H, Ng. Brown, A.B. Valdes JR *Clin. Chem* 29/6, 1109 - 1113 (1983)

EIAgen Ferritin KIT

REF LI4023

Σ 96 tests

Adaltis Italia S.p.A.








Via Cristoni, 12
40033 Casalecchio di Reno – (BO) Italy
Tel. +39-051-6136511 – Fax + 39-051-575280
www.adaltis.com

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

Conservare a 2...8 °C



SIMBOLI UTILIZZATI SULL'ETICHETTA

MTPLATE	Micropiastra
CONJ HRP	Coniugato
CAL0	Calibratore 0
CAL1	Calibratore 1
CAL2	Calibratore 2
CAL3	Calibratore 3
CAL4	Calibratore 4
CAL5	Calibratore 5
SUBS TMB	Substrato HS (TMB)
SOLN STOP	Soluzione bloccante
WASH BUF 20X	Soluzione di lavaggio 20X
LOT	Numero di lotto
REF	Codice di catalogo
	Data di scadenza (utilizzare entro...)
 2°C 8°C	Limitazioni di temperatura (conservare a 2...8°C)
	Numero di test
	Proteggere dalla luce solare
	Fabbricato da
	Attenzione, leggere le Istruzioni per l'Uso
IVD	Dispositivo diagnostico in vitro (solo per uso diagnostico in vitro)
	Rischio Biologico (vedere sezione 7 AVVERTENZE E PRECAUZIONI)

1.0 FINALITA' D'USO

Il kit EIAgen Ferritin è un metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione della Ferritina nel siero e plasma umano.

2.0 INTRODUZIONE E SPIEGAZIONE DEL TEST

La deficienza di ferro e la conseguente anemia è sicuramente il disturbo più comune nell'uomo (1). I dosaggi per il ferro come la capacità totale di legare ferro o altri saggi per la valutazione di composti contenenti ferro presenti nel corpo umano sono clinicamente significativi (2). I composti che immagazzinano ferro comprendono l'emoglobina, l'emosiderina, la mioglobina e i citocromi. In molti tessuti, la Ferritina rappresenta la principale riserva di ferro(3). La ferritina umana, dal peso molecolare di circa 450,000 daltons, è costituita da una porzione esterna proteica che avvolge un core di ferro. Ogni molecola di Ferritina può contenere fino a 4,000 atomi di ferro (4). In condizioni di normalità, può rappresentare il 25% del ferro totale presente nel corpo. La Ferritina è caratterizzata da numerosi isomeri (5). Alti livelli di Ferritina sono tipici nel citoplasma del sistema reticolo endoteliale, nel fegato, nella milza, e nel midollo osseo (6). I metodi comunemente usati per la determinazione del ferro, in alcuni tessuti, sono invasivi e causano trauma nel paziente e spesso mancano di sensibilità (7). La determinazione della Ferritina nel siero è utile nello stabilire modificazioni delle riserve corporee di ferro è un metodo non-invasivo che non comporta disagi al paziente. I livelli sierici di Ferritina possono essere misurati in modo routinario e sono utili nella rilevazione precoce di anemia in soggetti apparentemente sani (8, 9). La determinazione della ferritina nel siero è clinicamente significativa nel monitoraggio dei livelli di ferro nelle donne in gravidanza, nei donatori di sangue e nei pazienti in dialisi. Livelli elevati di Ferritina possono indicare un sovraccarico di ferro senza danni epatici, come si registra negli stadi precoci della emocromatosi idiopatica (10). La determinazione di Ferritina nel siero è impiegata nella valutazione non solo della riserva corporea di ferro ma anche di diverse condizioni cliniche quali l'infiammazione, l'epatopatia cronica e il tumore (11).

3.0 PRINCIPIO DEL TEST

EIAgen Ferritin kit è basato sulla cattura simultanea della Ferritina umana da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastra, l'altro coniugato con la perossidasi (HRP).

Dopo un determinato periodo di incubazione, la separazione dell'antigene libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

L'enzima presente nella frazione legata, reagendo con il Substrato TMB sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H₂SO₄).

La concentrazione della Ferritina nel campione è calcolata in base a una serie di calibratori.

L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di Ferritina presente nel campione.

4.0 MATERIALI CONTENUTI NEL KIT

4.1 MICROPIASTRA (codice 15PIA)

MTPLATE

1 micropiastra con 12x8 pozzetti separabili sensibilizzati con anticorpi monoclonali Anti-Ferritina.

Conservare a 2-8°C.

4.2 CALIBRATORI

6 flaconi contenenti Ferritina di fegato umana con gentamicina 0.01% come conservante.

Aprire la busta del micropiastra solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strips da utilizzare

Conservare a 2-8°C.

Calibratore	Simbolo	codice	concentrazione*	volume
Calibratore 0	CAL0	15CAL0	0 ng/mL	3 mL
Calibratore 1	CAL1	15CAL1	5 ng/mL	1.0 mL
Calibratore 2	CAL2	15CAL2	20 ng/mL	1.0 mL
Calibratore 3	CAL3	15CAL3	100 ng/mL	1.0 mL
Calibratore 4	CAL4	15CAL4	400 ng/mL	1.0 mL
Calibratore 5	CAL5	15CAL5	1000 ng/mL	1.0 mL

* concentrazione approssimata.

Gli standard calibrati contro il WHO 1st IS Ferritin Human Liver 80/602

4.3 CONIUGATO (codice 15HRP)

CONJ|HRP

1 flacone contiene 13 mL di anticorpo monoclonale anti-Ferritina coniugato con perossidasi di rafano (HRP).

Pronto all'uso

Conservare a 2-8°C

4.4 SUBSTRATO HS (LS.TMB-H202.HK)

SUBS|TMB

1 flacone con 13 ml di una miscela stabilizzata di TMB0. 25g/L (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) e H₂O₂ (Perossido d'Idrogeno).

Pronto all'uso

Conservare a 2-8°C

4.5 SOLUZIONE BLOCCANTE (LS.STOP.K)

SOLN|STOP

1 flacone con 13 ml di H₂SO₄ 0.3 M pronto all'uso.

Pronto all'uso

Conservare a 2-8°C

La scheda di sicurezza è a disposizione dell'utilizzatore professionale

4.6 SOLUZIONE DI LAVAGGIO 20X (cod. TLAVD) WASH|BUF|20X

1 flacone contenente 50 ml di washing buffer concentrato, contenente tampone fosfato 50mM pH 7.4 e Tween20 1g/l.

Preparazione della soluzione di lavaggio diluita: Diluire il contenuto del flacone (50 mL) a 1000 mL con acqua distillata.

Conservazione: la soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2 – 8°C. fino alla data di scadenza del kit.

5.0 CONSERVAZIONE E STABILITA' DOPO LA PRIMA APERTURA

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

6.0 MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI NON FORNITI NEL KIT

- Acqua distillata
- Dispensatori automatici.
- Lettore per micropiastre in grado di compiere letture di OD a 450, 405 e 620 nm.
- Pipette di precisione da 0.02 e 0.1 ml
- Puntali usa e getta
- Carta assorbente
- Carta millimetrata
- Sieri di controllo

7.0 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

7.1 NORME DI SICUREZZA

- I reagenti contengono Proclin 300^R e Gentamicina come conservanti.
- Evitare il contatto con reagenti che contengono perossido di idrogeno, acido solforico e conservanti che possono essere tossici se ingeriti. Non pipettare con la bocca.
- I calibratori contengono siero di origine umana. Pur essendo risultato negativo ai test per l'HbsAg e gli anticorpi anti HIV approvati dalla FDA, queste soluzioni vanno trattate come materiale potenzialmente infetto.
- Eseguire lo smaltimento dei rifiuti seguendo le leggi vigenti.

7.2 PRECAUZIONI TECNICHE

- Osservare la massima precisione nella diluizione e nella dispensazione dei reattivi.
- Non usare reattivi appartenenti a lotti diversi.
- Al fine di ottenere risultati affidabili e riproducibili leggere con attenzione le istruzioni all'uso ed ottemperare alle corrette pratiche di laboratorio.
- La fase di lavaggio è critica. Si consiglia di lavare con cura i pozzetti per evitare letture di assorbanza poco precise e falsamente elevate.

8.0 RACCOLTA DEL CAMPIONE E CONSERVAZIONE

La determinazione della può essere effettuata su plasma o su siero. Se il dosaggio non viene effettuato entro cinque giorni dal prelievo conservare il campione a -20°C.

9.0 PROCEDURA DEL TEST

9.1 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Si raccomanda di portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (18-25 °C) prima dell'uso.
- Agitare i reagenti delicatamente prima dell'uso. Evitare la formazione di schiuma.
- Poiché è necessario operare in doppio, allestire due pozzetti per ogni punto della curva Standard (Calibratori 0-5)), due per ogni Campione ed una per il Bianco.

9.2 PROCEDURA DI DISPENSAZIONE E INCUBAZIONE

- Dispensare** 20 µl di ciascun calibratore e campione in doppio, lasciare un pozzetto vuoto per il bianco.
- Dispensare** 100 µl di coniugato nei pozzetti dei calibratori e dei campioni, non aggiungere coniugato nel pozzetto del bianco.
- Incubare** 1 h a +22-28°C (temperatura ambiente).
- Allontanare** la miscela di reazione, **lavare** aggiungendo in ogni pozzetto 0,3 mL di soluzione di lavaggio diluita; ripetere due volte il lavaggio allontanando completamente il liquido.
- Dispensare:** 100 µl di Substrato in **tutti** i pozzetti.
- Incubare** 10 minuti a temperatura ambiente (22±28°C), al riparo dalla luce.
- Dispensare:** 100 µl di Soluzione bloccante in **tutti** i pozzetti.
- Leggere** la densità ottica a 450 nm e 405 nm con il filtro di riferimento selezionato a 620 nm entro 30 minuti. Se è possibile farlo in automatico azzerare con il Bianco.

10.0 CALCOLO DEI RISULTATI

10.1 CONTROLLO DI QUALITA'

Una corretta pratica di laboratorio richiede l'utilizzo, in ogni seduta di dosaggio, di tutti i controlli (basso medio ed alto).

Un numero statisticamente significativo di controlli dovrebbe essere saggiato per stabilire i valori medi e i limiti di accettabilità per garantire una corretta performance del test.

10.2 CONVERSIONE DELLE OD

Le densità ottiche superiori a 2.0 potrebbero essere fuori dal range di misurazione di alcuni lettori di micropiastre. È necessario in questi casi eseguire anche una lettura a 405 nm (= lunghezza d'onda alla quale si trova la spalla del picco) oltre alla lettura a 450 nm (lunghezza d'onda del picco) e a 620 nm (filtro di riferimento per la sottrazione delle interferenze dovute alla plastica).

Se si utilizzano i lettori non in grado di leggere a 3 lunghezze d'onda contemporaneamente, si raccomanda di procedere come segue:

- leggere la micropiastro a 450 nm e a 620 nm.
- leggere di nuovo la micropiastro a 405 nm e 620 nm.
- selezionare i pozzetti le cui OD a 450 nm sono più alte di 2.0.
- selezionare le corrispondenti OD a 405 nm e moltiplicare questi valori a 405 nm per fattore di conversione 3.0 (dove OD 450/OD 405 = 3.0), cioè: $OD_{450\text{ nm}} = OD_{405\text{ nm}} \times 3.0$

Nota bene: il fattore 3.0 è solamente suggerito. Per migliore accuratezza, gli utilizzatori devono calcolare il fattore di conversione sul proprio lettore.

10.3 ELABORAZIONE DEI DATI- METODO AUTOMATICO

Sottrarre il valore di OD del Bianco dai valori di OD dei campioni e del calibratori

Utilizzare i metodi: 4 parametri logistici o cubic spline come algoritmo di calcolo.

10.4 ELABORAZIONE DEI DATI- METODO MANUALE

- Sottrarre il valore di OD del Bianco dai valori di OD dei campioni e del calibratori
- Calcolare l'OD media di ciascun punto della curva standard e di ogni campione.
- Riportare su carta log-log i valori dei calibratori della Ferritina ed estrapolare la retta.
- Leggere le corrispondenti concentrazioni della Ferritina dei controlli e dei campioni

10.5 INTERVALLO DI MISURA

Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Ferritina da 5 ng/mL a 1.000 ng/mL. Per campioni con concentrazione superiore a 1000 ng/mL diluire il campione con il calibratore 0.

11.0 VALORI ATTESI

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire il proprio range basandosi sulla popolazione dei pazienti.

I valori plasmatici di Ferritina sono compresi nei seguenti intervalli:

N° pazienti	Media (ng/mL)	Range (ng/mL)
Donne in età fertile:50	53	6 - 180
Donne in post-menopausa 30	105	8 - 350
Uomini 50	175	20 - 400

12.0 LIMITI DELLA PROCEDURA

- In questo metodo, non è stato osservato effetto Hook fino a 50,000 ng/mL di Ferritina.
- Non sono state osservate interferenze da fattori reumatoidi, bilirubina, emoglobina, colesterolo e trigliceridi.
- Per uso diagnostico, utilizzare i risultati ottenuti con questo test in aggiunta ad altri dati (ad es. sintomi, risultati di altri test, valutazioni cliniche)

13.0 CARATTERISTICHE DEL SAGGIO

13.1 PRECISIONE

a) Precisione Intra-saggio.

La precisione Intrasaggio è stata valutata in più replicati su tre differenti sieri di controllo testati in un'unica seduta analitica. La variabilità intrasaggio è riportata di seguito:

Campioni di siero	1	2	3
Numero di Replicati	16	16	16
FerritinaMedia (ng/mL)	15.6	76.1	160.2
Deviazione Standard	0.84	2.8	5.2
CV%	5.4	3.7	3.24

b) Precisione Inter-saggio.

La precisione Intersaggio è stata valutata su tre differenti sieri di controllo testati in due diverse sedute analitiche. La variabilità intersaggio è riportata di seguito:

Campioni di siero	1	2	3
Numero di Replicati	16	16	16
FerritinaMedia (ng/mL)	15.4	78.2	165.2
Deviazione Standard	0.88	3.6	6.93
CV%	5.7	4.6	4.2

13.2 RECUPERO

A due pazienti sono stati aggiunti quantità note crescenti di Ferritina. Il recupero medio con riferimento alle concentrazioni originali è stato di 98.0 %.

	Atteso	Osservato	
	Concentrazioni	Concentrazione	
	(ng/mL)	(ng/mL)	% Recupero
CAMPIONE 1			
Q aggiunta: 18			
50 ng/ml	68.0	65.0	95.6
100 ng/ml	118	122	103.4
200 ng/ml	218	210	96.3
CAMPIONE 2			
Q aggiunta: 128			
50 ng/ml	178	169	94.9
100 ng/ml	228	234	102.6
200 ng/ml	328	317	96.6
CAMPIONE 3			
Q aggiunta: 8.7			
12.5 ng/ml	21.2	22.4	106.2
25 ng/ml	33.7	31.8	94.4
50 ng/ml	58.7	56.4	96.1
100 ng/ml	108.7	105.9	97.4

13.3 LINEARITÀ

Due pazienti sono stati scalarmente diluiti con lo standard zero in uno studio di linearità. La media del recupero è stata di 103.5 %.

	Concentrazioni e Attesa (ng/mL)	Concentrazione Osservata (ng/mL)	% di Atteso
Campione 1			
Diluzione			
Non diluito		86	
1:2	43.0	45.1	105.4
1:4	21.5	22.1	102.8
1:8	10.75	12.4	107.9
Campione 2			
Diluzione			
Non diluito		128	
1:2	64	65	101.6
1:4	32	30.4	93.7
1:8	16	17.1	106.1

13.4 CONFRONTO TRA METODI

EIAgen Ferritin kit (y) è stato confrontato con un altro metodo commerciale RIA (x).

$$Y = 2.8 + 1.06X$$

$$r=0.99$$

13.5 SENSIBILITÀ

La minima concentrazione determinabile di Human Ferritina da questo test è 1.0 ng/mL.

13.6 SPECIFICITÀ

Le cross reattività dell' anticorpo calcolate al 50% secondo Abraham sono mostrate nella tabella:

Iso Ferritina di Fegato	100.0 %
Iso Ferritina di Milza	80.0 %
Iso Ferritina di Cuore	12.0 %

14.0 AUTOMAZIONE

I protocolli applicativi per una corretta automazione sui dispositivi di analisi (Labotech, Personal lab e Nexgen) di micropiastre ADALTIS sono disponibili dietro richiesta direttamente ad ADALTIS.

15.0 SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

L'aderenza alla procedura e alle specifiche, così come il corretto uso dei reagenti e l'opportuna dispensazione possono evitare i seguenti tipi di errori.

ERRORE	POSSIBILI CAUSE e SUGGERIMENTI
OD molto diverse (\pm 50%) da quelle riportate nel QC	<ul style="list-style-type: none"> errato volume di dispensazione dei campioni o dei reagenti (suggerimento: controllare la corrispondenza fra il volume impostato nelle pipette e quello richiesto dal saggio, tararle nuovamente) errata temperatura o errato tempo di incubazione (suggerimento: manutenzione più scrupolosa dell'incubatore, annotare all'inizio dell'incubazione) errore nell'esecuzione dei lavaggi e della lettura fotometrica (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti) contaminazione del Substrato (suggerimento: usare solo contenitori di plastica monouso puliti)
Risultati poco riproducibili	<ul style="list-style-type: none"> volume di dispensazione dei reagenti e campioni non costante (suggerimento: controllare la precisione delle pipette e la corrispondenza tra il volume dispensato e quello richiesto dal saggio, nel caso tararle nuovamente) errore nell'esecuzione dei lavaggi e della lettura fotometrica (suggerimento: controllare il funzionamento o le impostazioni dei rispettivi strumenti) contaminazione del substrato (suggerimento: usare contenitori di plastica monouso puliti) inquinamento o degradazione dei reagenti (suggerimenti: utilizzare puntali appropriati, contenitori per il travaso dei reagenti, monouso adatti e acqua distillata o equivalente)
Nessuna reazione colorimetrica dopo l'aggiunta del Substrato.	<ul style="list-style-type: none"> alcuni reagenti non sono stati dispensati forte contaminazione del coniugato o del substrato Errata sequenza di esecuzione (es. dispensazione accidentale di reagenti in una sequenza sbagliata o dal contenitore sbagliato)
Reazione troppo blanda (OD troppo basse)	<ul style="list-style-type: none"> tempo di incubazione troppo breve, temperature di incubazione troppo basse
Reazione troppo intensa (OD troppo alte)	<ul style="list-style-type: none"> tempo di incubazione troppo lungo o temperatura di incubazione troppo alta qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione) lavaggio non efficiente (coniugato non propriamente rimosso)
Inspiegabili risultati aberranti	<ul style="list-style-type: none"> contaminazione delle pipette, dei puntali o dei contenitori lavaggio incostante e insufficiente (coniugato non propriamente rimosso)
CV% intrasaggio elevato	<ul style="list-style-type: none"> reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)
CV% intersaggio elevato	<ul style="list-style-type: none"> condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperature) controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con stessi intervalli; suggerimento: controllare la sequenza di dispensazione) variabilità intrinseca degli operatori

16.0 BIBLIOGRAFIA

1. Fairbanks VF, Bentler E. Hematology. Williams, Bentler, Erslev, Rundles, editors. New York: McGraw Hill; 1972. p 305-26.
2. Colltrell DB. *Lab Mgmt* 1978 Feb.
3. Jacobs A, Worwood M. *Prog Hematol* 1975;9:1.
4. Forman DT, Vye MV. *Clin Chem* 1980;26(1):145-47.
5. Hazard JT, Yokota M, Arosio P, Drysdale J. *Blood* 1977;49(139).
6. Baur JD, Gradwohl. *Clin Meth and Diag* 1970;22(1):436.
7. Jacobs A. *Fed Proc* 1977;36(7).
8. Schrier S. Hematology. In: Rubenstein E, Federman D, editors. Scientific American. New York: Scientific American Inc.; 1980. Chapter V.
9. White D, Kramer D, Johnson G, Dick F, Hamilton H. *A J C P* 1986 Feb.
10. Valberg L. *CMA J* 1980;122:1240.
11. Forman D, Parker S. *Ann Clin Lab Sci* 1980;10:345.
12. Engvall E. Methods in Enzymology. VanVunakis H, Langone JJ, editors. New York: Academic Press; 1980. Volume 70; p 419-92.
13. Uotila M, Ruoslahti E, Engvall E. *J Immunol Methods* 1981;42:11-15.
14. Simes MA, Addiego Jr JE, Dallman PR. *Blood* 1974;43:581.
15. Walter G.O., Miller F.W., Wer wood, M. J. Clin. Path. 29 770 - 772 (1973)
16. Watanabe, N. Niitsu, Y. Ohtsuka, S. Kosaki, J. Kohgo, Y. Urushisaki, I. Kato, K. Ishikawa, E. Clin. Chem., 25/1, 80 - 82 (1979).
17. Van Oost, S.A. Willekens, F.L.A., B.R. Van Neebors, B.R., Van Den Beld, B. Clin. Chem, 28/12, 2429 - 2433 (1982).
18. Ronald H, Ng. Brown, A.B. Valdes JR Clin. Chem 29/6, 1109 - 1113 (1983)

EIAgen Ferritin KIT

REF LI4023

▽ 96 tests

Adaltis Italia S.p.A.

Via Cristoni, 12
40033 Casalecchio di Reno – (BO) Italy
Tel. +39-051-6136511 – Fax +39-051-575280
www.adaltis.com

UITSLUITEND VOOR DIAGNOSTISCH GEBRUIK IN








VITRO

Bewaren bij 2...8 °C



nl

GEBRUIKTE SYMBOLEN OP ETIKETTEN

MTPLATE	Microplaat
CONJ HRP	Conjugaat
CAL0	Kalibrator 0
CAL1	Kalibrator 1
CAL2	Kalibrator 2
CAL3	Kalibrator 3
CAL4	Kalibrator 4
CAL5	Kalibrator 5
SUBS TMB	HS-substraat (TMB)
SOLN STOP	Stopoplossing
WASH BUF 20X	Wasbuffer 20X
LOT	Lotnummer
REF	Cataloguscode
	Vervaldatum (Gebruiken voor...)
 2°C 8°C	Temperatuurbepanking (bewaren bij 2..8°C)
	Aantal tests
	Verwijderd houden van zonlicht
	Geproduceerd door
	Attentie, zie de gebruiksaanwijzing
IVD	In vitro-diagnostisch medisch product (In vitro-diagnostisch gebruik)
	Biologische risico's (zie paragraaf 7 WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMATREGELEN)

1.0 BEDOELD GEBRUIK

De EIAgen Ferritin-kit is een colorimetrische immuno-enzymmethode voor de kwantitatieve bepaling van de concentratie ferritine in menselijk serum en plasma.

2.0 SAMENVATTING EN TOELICHTING OP DE TEST

Een van de meestvoorkomende menselijke aandoeningen is ijzerdeficiëntie in voedsel en de daaruit resulterende anemie (1). De assays voor ijzer, de totale ijzerbindende capaciteit en andere vaststellingen van ijzerverbindingen in het lichaam zijn klinisch significant (2). IJzeropslagverbindingen in het lichaam zijn hemoglobine, hemosiderine, myoglobine en de cytochromen. In de meeste weefsels is ferritine een van de belangrijkste ijzeropslagproteïnen (3). Menselijke ferritine heeft een moleculair gewicht van ongeveer 450.000, en bestaat uit een proteïneschild rond een ijzerkern. Iedere ferritine-molecuul kan maar liefst 4.000 ijzeratomen bevatten (4). Onder normale condities kan dit 25% van de totale hoeveelheid ijzer in het lichaam representeren. Daarnaast kan ferritine in verschillende isomeren aangetroffen worden (5). Hoge concentraties van ferritine wordt aangetroffen in het cytoplasma van het reticulo-endotheliale systeem, de lever, de milt en het beenmerg (6). Eerder gebruikte methoden om ijzer in dergelijke weefsels te meten zijn invasief, veroorzaken patiënttrauma en zijn niet voldoende gevoelig (7). De meting van ferritine in serum is nuttig bij het bepalen van veranderingen in ijzeropslag in het lichaam, en is niet-invasief met relatief weinig ongemak voor de patiënt. Ferritineniveaus in serum kunnen routinematig gemeten worden en zijn in het bijzonder nuttig bij de vroegtijdige detectie van anemie door ijzerdeficiëntie bij ogenschijnlijk gezonde mensen (8, 9). Ferritinemetingen in serum zijn tevens klinisch significant voor het bewaken van de ijzerniveaus van zwangere vrouwen, bloeddonors en nierdialysepatiënten. Hoge ferritineniveaus kunnen wijzen op ijzeroverlading zonder duidelijke leverbeschadiging, zoals opgemerkt kan worden in vroege stadia van idiopathische hemochromatose (10). Ferritineniveaus in serum zijn ook gebruikt om klinische condities te evalueren die niet gerelateerd zijn aan ijzeropslag, zoals ontsteking, chronische leveraandoeningen en maligniteit (11).

3.0 PRINCIPE VAN DE ASSAY

De EIAgen Ferritin-kit is gebaseerd op de gelijktijdige verbinding van menselijke ferritine aan twee monoklonale antilichamen: de één geïmmobiliseerd in microputjes, de ander geconjugeerd met mierikswortelperoxidase (HRP). Na incubatie wordt de gebonden/vrije separatie uitgevoerd door een eenvoudige vaste-fase-wassing. Het enzym in het gebonden gedeelte reageert met het substraat (TMB), waarbij een blauwe kleur wordt ontwikkeld, die geel wordt na toevoeging van de stopoplossing (H₂SO₄).

De ferritineconcentratie in het monster wordt berekend op basis van een serie kalibratoren.

De kleurintensiteit is proportioneel met de ferritineconcentratie in het monster.

4.0 INHOUD VAN DE KIT

4.1 MICROPLAAT (code 15PIA)

MTPLATE

1 microplaat, 12 x 8 scheidbare putjes die gecoat zijn met monoclonale anti-ferritine antilichamen.

Bewaren bij 2-8°C.

4.2 KALIBRATOREN

6 flesjes met ferritine uit de menselijke lever met gentamicine 0,01% als conserveringsmiddel.

Open de verpakking van de gecoate microplaat alleen wanneer deze op kamertemperatuur is, en sluit hem onmiddellijk na gebruik.

Bewaren bij 2-8°C.

Kalibrator	Symbol	Code	Concentratie*	Volume
Kalibrator 0	CAL0	15CAL0	0 ng/mL	3 mL
Kalibrator 1	CAL1	15CAL1	5 ng/mL	1,0 ml
Kalibrator 2	CAL2	15CAL2	20 ng/mL	1,0 ml
Kalibrator 3	CAL3	15CAL3	100 ng/mL	1,0 ml
Kalibrator 4	CAL4	15CAL4	400 ng/mL	1,0 ml
Kalibrator 5	CAL5	15CAL5	1000 ng/mL	1,0 ml

* concentratie bij benadering.

De kalibratoren zijn gekalibreerd tegen de WHO IS Ferritin Human Liver 80/602

4.3 CONJUGAAT (code 15HRP)

CONJ|HRP

1 flesje met 13 ml monoklonale anti-ferritine antilichamen-conjugaat met mierikswortelperoxidase (HRP)

Gebbruiksklaar.

Bewaren bij 2-8°C.

4.4 HS-SUBSTRAAT (LS.TMB-H202.HK)

SUBS|TMB

1 flesje met 13 ml van een gestabiliseerd mengsel van TMB 0,25g/l (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) en (waterstofperoxide).

Gebbruiksklaar.

Bewaren bij 2-8°C.

4.5 STOPOPLOSSING (LS.STOP.K)

SOLN|STOP

1 flesje met 13 ml 0,3 M.H₂SO₄

Gebruiksklaar

Bewaren bij 2-8°C

De *materiaalspecificaties zijn verkrijgbaar op verzoek van het laboratoriumpersoneel.*

4.6 WASBUFFER20X (cod.TLAVD) **WASH|BUF|20X**

1 fles met 50 ml geconcentreerde wasbuffer, met fosfaatbuffer 50mM pH 7,4 en Tween20 1g/l.

Prepareren van de wasbufferweroplossing: verdun de inhoud van het wasbufferconcentraat(50 ml) tot 1000 ml met gedistilleerd water.

OPSLAG bewaren bij kamertemperatuur (20-27°C). Stabiel tot de vervaldatum.

5.0 OPSLAG EN STABILITEIT NA EERSTE OPENING

- De onderdelen van de kit moeten bewaard worden bij 2-8°C en moeten beschermd worden tegen zonlicht.

6.0 BENODIGDE MATERIELEN EN APPARATUUR DIE NIET BIJGELEVERD ZIJN

- Gedistilleerd water
- Automatische pipetten.
- Microplaat-reader die geschikt is voor het meten van de OD's bij 450, 405 en 620 nm
- Precisiepipetten: 0,02 en 0,1 ml
- Wegwerp-pipetpunten
- Absorberend papier
- Grafiekpapier
- Controleserums

7.0 WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

7.1 VEILIGHEIDSMATREGELEN

- Reagentia bevatten Proclin en Gentamicine als conserveringsmiddelen.
- Vermijd contact met reagentia die waterstofperoxide, zwavelzuur en conserveringsmiddelen bevatten die giftig kunnen zijn bij inname. Niet pipetteren met de mond.
- Kalibratoren bevatten menselijk serum. Ze zijn niet-reactief bevonden op HbsAg en anti-HIV antilichamen met behulp van door FDA goedgekeurde methoden; deze producten moeten echter als potentieel gevaarlijk worden beschouwd.
- Volg alle plaatselijke en nationale voorschriften m.b.t. het wegwerpen van afvalmateriaal strikt op.

7.2 TECHNISCHE VOORZORGSMAATREGELEN

- Wees uiterst precies bij het verdunnen en pipetteren van de reagentia.
- Gebruik geen reagentia die tot verschillende lots behoren.
- Betrouwbare en reproduceerbare resultaten worden verkregen wanneer de assay-procedure wordt uitgevoerd met volledig begrip van de gebruiksaanwijzing in de verpakking, en met naleving van de "goede laboratoriumpraktijk" (GLP).
- De wasprocedure is essentieel. Onvoldoende wassing beïnvloedt de precisie en veroorzaakt foutief verhoogde absorptielezingen.

8.0 MONSTERVERZAMELING EN OPSLAG

Ferritin-bepaling kan uitgevoerd worden met plasma of serum. Als het doseren niet plaatsvindt binnen vijf dagen na verzameling, sla het monster dan op bij -20°C.

9.0 ASSAY-PROCEDURE

9.1 VOORBEREIDING VOOR DE ASSAY

- Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen (18-25 °C) voor gebruik.
- Alle reagentia moeten gemengd worden door de flesjes voorzichtig om te keren of rond te wentelen voor gebruik. Niet laten schuimen
- Aangezien de assay in duplicaat uitgevoerd moet worden, moeten twee putjes geprepareerd worden voor ieder punt van de standaardcurve (0-5 kalibratoren), twee voor ieder monster en één voor het blanco materiaal.

9.2 STAPPEN VOOR HET PIPETTEREN EN DE INCUBATIE

- Pipetteer** 20 µl van iedere kalibrator en monster in duplicaat, waarbij u één putje leeg houdt voor het blanco materiaal.
- Pipetteer** 100 µl conjugaat in de putjes van de kalibratoren en de monsters; voeg geen conjugaat toe in het lege putje.
- Incubeer** gedurende 1 uur bij +22-28°C (kamertemperatuur).
- Verwijder** het reagensmengsel, en **voer een wassing uit** door 0,3 ml verdunde wasoplossing in ieder putje te pipetteren; voer de wassing nog tweemaal uit om de vloeistof volledig te verwijderen.
- Pipetteer:** 100 µl substraat in ieder putje.
- Incubeer** 10 minuten in het donker bij kamertemperatuur (22+28°C).
- Pipetteer:** 100 µl stopoplossing in ieder putje.
- Lees** de optische dichtheid, binnen 30 minuten, bij 450 nm en 405 nm, waarbij het referentiefilter op 620 nm ingesteld is. Indien het mogelijk is om dit automatisch te doen, dient u de reader op nul te zetten met behulp van het lege putje.

10.0 BEREKENING VAN RESULTATEN

10.1 KWALITEITSCONTROLE

De goede laboratoriumpraktijk vereist dat alle controles (laag, gemiddeld en hoog) worden uitgevoerd. Een statistisch significant aantal controles dient geanalyseerd te worden om gemiddelde waarden en acceptabele bereiken vast te stellen, om de juiste prestaties te verzekeren.

10.2 OD-CONVERSIE

De optische dichtheden (OD's) van sommige kalibratoren en monsters kunnen hoger dan 2,0 zijn; in dergelijke gevallen kunnen ze buiten het meetbereik van de microplaat-reader vallen. Het is daarom noodzakelijk om bij OD's van hoger dan 2,0 een lezing op 405 nm (=golflengte van de piekschouder) uit te voeren naast de lezing op 450 nm (piekgolflengte) en 620 (referentiefilter voor de aftrekking van interferenties ten gevolge van het plastic).

Als er microplaat-readers worden gebruikt die niet in staat zijn om 3 golflengtes tegelijk te lezen, wordt geadviseerd om als volgt te werk te gaan:

- Lees de microplaat op 450 nm en op 620 nm.
- Lees de plaat nogmaals op 405 nm en 620 nm.
- Kijk welke putjes een OD bij 450 nm hebben die hoger dan 2,0 is
- Selecteer de corresponderende OD's bij 405 nm en vermenigvuldig deze waarden bij 405 nm met de conversiefactor 3,0 (waarbij OD 450/OD 405 = 3,0), dat wil zeggen: $OD\ 450\ nm = OD\ 405\ nm \times 3,0$

Waarschuwing: de conversiefactor 3,0 is slechts een richtlijn. Voor grotere nauwkeurigheid moeten gebruikers de conversiefactor berekenen die specifiek is voor hun eigen reader.

10.3 GEGEVENSREDUCTIE - AUTOMATISCHE METHODE

Trek de OD van het lege putje af van de OD's van de kalibrator en de monsters.

Gebruik de 4 parameters logistics – bij voorkeur – of de cubic spline-functie als berekeningsalgoritme.

10.4 GEGEVENSREDUCTIE HANDMATIGE METHODE

- Trek de OD van het lege putje af van de OD's van de kalibrator en de monsters.
- Bereken de gemiddelde OD voor ieder punt in de standaardcurve en voor ieder monster.
- Teken op papier de waarden van de ferritine-kalibratoren, en extrapoleer vervolgens de rechte lijn.
- Lees de corresponderende ferritine-concentraties van de controles en de monsters

10.5 MEETBEREIK

Met deze methode kunnen ferritine-concentraties van 5 ng/ml tot 1.000 ng/ml bepaald worden. Gebruik de nulkalibrator om monsters te verdunnen met concentraties > 1.000 ng/ml.

11.0 VERWACHTE WAARDEN

Ieder laboratorium dient zijn eigen bereik op basis van de patiëntpopulatie vast te stellen.

De ferritinewaarden in plasma zijn opgenomen in de volgende bereiken:

Aantal patiënten	Gemiddelde (ng/mL)	Bereik (ng/mL)
Vruchtbare vrouwen:50	53	6 - 180
Vrouwen na de menopauze: 30	105	8 - 350
Mannen 50	175	20 - 400

12.0 BEPERKINGEN VAN DE PROCEDURE

- Met deze methode is geen "hook-effect" geobserveerd tot 50.000 ng/ml ferritine.
- Met deze methode zijn geen interferenties vanuit rheumatoïde factoren, bilirubine, hemoglobine, cholesterol en triglycerides geobserveerd.
- Voor diagnostische doeleinden moeten de resultaten die verkregen zijn uit deze test altijd gebruikt worden in combinatie met andere gegevens (bv. symptomen, resultaten van andere tests, klinische indrukken) van de arts.

13.0 PRESTATIEKENMERKEN

13.1 PRECISIE

a) Precisie binnen de test.

Precisie binnen de run is geëvalueerd via replicaatbepalingen van drie verschillende controleserums die geanalyseerd zijn in één assay. De variabiliteit binnen de test wordt hieronder vermeld:

Serummonster	1	2	3
Aantal replicaten	16	16	16
Gemiddelde ferritine (ng/mL)	15.6	76.1	160.2
Standaarddeviatie	0.84	2.8	5.2
% CV	5.4	3.7	3.24

b) Precisie tussen de tests.

Precisie tussen de runs is geëvalueerd via replicaatbepalingen van drie verschillende controleserums die geanalyseerd zijn in twee verschillende analyses. De variabiliteit tussen de tests wordt hieronder vermeld:

Serummonster	1	2	3
Aantal replicaten	16	16	16
Gemiddelde ferritine (ng/mL)	15.4	78.2	165.2
Standaarddeviatie	0.88	3.6	6.93
CV%	5.7	4.6	4.2

13.2 RECOVERY

Aan twee patiënten werden bekende hoeveelheden ferritine in een toenemende hoeveelheid gegeven.

De gemiddelde recovery vergeleken met de eerdere concentraties was 98,0 %.

	Verwachte concentratie (ng/ml)	Geobserveerde concentratie (ng/ml)	Recovery %
MONSTER 1			
Hoefv. toegevoegd: 18			
50 ng/ml	68.0	65.0	95.6
100 ng/ml	118	122	103.4
200 ng/ml	218	210	96.3
MONSTER 2			
Hoefv. toegevoegd: 128			
50 ng/ml	178	169	94.9
100 ng/ml	228	234	102.6
200 ng/ml	328	317	96.6
MONSTER 3			
Hoefv. toegevoegd: 8,7			
12,5 ng/ml	21.2	22.4	106.2
25 ng/ml	33.7	31.8	94.4
50 ng/ml	58.7	56.4	96.1
100 ng/ml	108.7	105.9	97.4

13.3 LINEARITEIT

Twee patiëntmonsters werden in serie verdund met nulcalibrator voor een lineariteitsonderzoek. De gemiddelde recovery was 103,5 %.

	Verwachte concentratie (ng/mL)	Geobserveerde concentratie (ng/mL)	Verwacht%
Monster 1			
Verdunding			
Niet verdund		86	
1:2	43.0	45.1	105.4
1:4	21.5	22.1	102.8
1:8	10.75	12.4	107.9
Monster 2			
Verdunding			
Niet verdund		128	
1:2	64	65	101.6
1:4	32	30.4	93.7
1:8	16	17.1	106.1

13.4 METHODEVERGELIJKING

De EIAgen Ferriti-kit (y) is vergeleken met een andere RIA in de handel verkrijgbare methode (x).

$$Y = 2,8 + 1,06X$$

$$r=0,99$$

13.5 GEVOELIGHEID

De minimaal detecteerbare concentratie van menselijke ferritine door deze assay wordt geschat op 1,0 ng/mL.

13.6 SPECIFICITEIT

De kruisreactiviteit van antilichamen, zoals berekend op 50% volgens Abraham, wordt in de volgende tabel weergegeven:

Iso-leverferritine	100,0 %
Iso-miltferritine	80,0 %
Iso-hartferritine	12,0 %

14.0 AUTOMATISERING

Toepassingsprotocollen voor de juiste automatisering op de Adaltis microtiterstrip-analyzers (Labotech, Personal Lab en Nexgen) zijn op verzoek rechtstreeks bij Adaltis verkrijgbaar.

15.0 SUGGESTIES VOOR HET OPLOSSEN VAN PROBLEMEN

Naleving van de assay-procedure en specificaties, evenals een correct gebruik van reagentia en goede pipettering, kan helpen om de volgende fouten te vermijden.

FOUT	MOGELIJKE OORZAKEN / SUGGESTIES
OD zeer verschillend (\pm 50%) van OD op QC	- onjuist pipetteringsvolume van reagentia (suggestie: controleer de overeenkomst tussen het gepipetteerde volume en het vereiste volume voor de assay; kalibreer de pipetten opnieuw) - onjuiste temperatuur of onjuiste incubatietijd (suggestie: wees zorgvuldiger in het incubatoronderhoud; noteer het begin van de incubatie) - fout bij het wassen of in de fotometerlezing (suggestie: controleer de werking of de instellingen van de betreffende instrumenten) - verontreiniging van substraat of conjugaat (suggestie: gebruik alleen schone wegwerphouders van plastic)
Lage reproduceerbare resultaten	- niet-constant pipetteringsvolume van monsters of reagentia (suggestie: controleer de precisie van de pipetten en de overeenkomst tussen het gepipetteerde volume en het vereiste volume voor de assay; kalibreer de pipetten opnieuw) - fout bij het wassen of het lezen (suggestie: controleer de werking of de instellingen van de betreffende instrumenten) - verontreiniging van substraat (suggestie: gebruik alleen schone wegwerphouders van plastic) - vervuiling of degradatie van reagentia (suggestie: gebruik de juiste punten, schone wegwerphouders voor reagentia en gedistilleerd water van hoge kwaliteit)
geen colorimetrische reactie na toevoeging van substraat	- geen reagens gepipetteerd - sterke verontreiniging van conjugaat of substraat - fouten in de uitvoering van de assay-procedure (bv. onbedoelde pipettering van reagentia in onjuiste volgorde of uit verkeerde flesjes, enz.)
te zwakke reactie (te lage OD's)	- incubatietijd te kort, incubatietemperatuur te laag
te sterke reactie (te hoge OD's)	- incubatietijd te lang, incubatietemperatuur te hoog - waterkwaliteit voor de wasbuffer is onvoldoende (lage deionisatiegraad) - onvoldoende wassingen (conjugaat niet volledig verwijderd)
onverklaarbare uitschieters	- verontreiniging van pipetten, punten of houders - inconstante en onvoldoende wassingen (conjugaten niet volledig verwijderd)
te hoge binnen-run CV%	- reagentia en/of strips niet op kamertemperatuur gebracht voor gebruik - microplaatwaster wast niet goed (suggestie: reinig de kop van de washer)
te hoge tussen-run CV%	- incubatiecondities niet constant (tijd of temperatuur) - controles en monsters niet gepipetteerd op hetzelfde tijdstip (met dezelfde intervallen) (controleer de pipetteringsvolgorde) - persoonsgebonden variatie

16.0 REFERENTIES

- Fairbanks VF, Bentler E. Hematology. Williams, Bentler, Erslev, Rundles, editors. New York: McGraw Hill; 1972. p 305-26.
- Colltrell DB. *Lab Mgmt* 1978 Feb.
- Jacobs A, Worwood M. *Prog Hematol* 1975;9:1.
- Forman DT, Vye MV. *Clin Chem* 1980;26(1):145-47.
- Hazard JT, Yokota M, Arosio P, Drysdale J. *Blood* 1977;49(139).
- Baur JD, Gradwohls. *Clin Meth and Diag* 1970;22(1):436.
- Jacobs A. *Fed Proc* 1977;36(7).
- Schrier S. Hematology. In: Rubenstein E, Federman D, editors. Scientific American. New York: Scientific American Inc.; 1980. Chapter V.
- White D, Kramer D, Johnson G, Dick F, Hamilton H. *A J C P* 1986 Feb.
- Valberg L. *CMA J* 1980;122:1240.
- Forman D, Parker S. *Ann Clin Lab Sci* 1980;10:345.
- Engvall E. Methods in Enzymology. VanVunakis H, Langone JJ, editors. New York: Academic Press; 1980. Volume 70; p 419-92.
- Uotila M, Ruoslahti E, Engvall E. *J Immunol Methods* 1981;42:11-15.
- Simes MA, Addiego Jr JE, Dallman PR. *Blood* 1974;43:581.
- Walter G.O., Miller F.W., Wer wood, M. *J. Clin. Path.* 29 770 - 772 (1973)
- Watanabe, N. Niitsu, Y. Ohtsuka, S. Kosaki, J. Kohgo, Y. Urushisaki, I. Kato, K. Ishikawa, E. *Clin. Chem.* 25/1, 80 - 82 (1979).
- Van Oost, S.A. Willekens, F.L.A., B.R. Van Neebors, B.R., Van Den Beld, B. *Clin. Chem.* 28/12, 2429 - 2433 (1982).
- Ronald H, Ng. Brown, A.B. Valdes JR *Clin. Chem* 29/6, 1109 - 1113 (1983)

EIAgen Ferritin KIT

REF LI4023

Σ 96 tests

Adaltis Italia S.p.A.






Via Cristoni, 12
40033 Casalecchio di Reno – (Bologna) Itália
Tel.: +39-051-6136511 – Fax + 39-051-575280
www.adaltis.com

APENAS PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO 

Conservar a 2...8°C

pt

SÍMBOLOS USADOS NOS RÓTULOS

MTPLATE	Microplaca
CONJ HRP	Conjugado
CAL0	Calibrador 0
CAL1	Calibrador 1
CAL2	Calibrador 2
CAL3	Calibrador 3
CAL4	Calibrador 4
CAL5	Calibrador 5
SUBS TMB	Substrato HS (TMB)
SOLN STOP	Solução de Paragem
WASH BUF 20X	Tampão de lavagem 20X
LOT	Número de lote
REF	Código de catálogo
 8°C	Prazo de validade (Usar até...)
2°C 	Limite de temperatura (conservar a 2...8°C)
Σ	Número de testes
	Conservar ao abrigo da luz solar
	Fabricado por
	Atenção, consulte as Instruções de Utilização
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro (uso diagnóstico in vitro)



Riscos Biológicos (Consulte a secção 7 – ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES).

1.0 UTILIZAÇÃO PREVISTA

O kit EIAgen Ferritin é um método imunoenzimático colorimétrico para a determinação quantitativa da concentração de Ferritina no soro e plasma humano.

2.0 RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Um dos distúrbios humanos mais prevalentes é a deficiência dietética do ferro e a anemia daí resultante (1). As análises ao ferro, capacidade de ligação total do ferro e outras avaliações dos compostos de ferro são clinicamente significativas (2). Os compostos de armazenamento de ferro no organismo incluem a hemoglobina, hemosiderina, mioglobina e os citocromos. Na maioria dos tecidos, a ferritina é uma importante proteína de armazenamento do ferro (3). A ferritina humana tem um peso molecular de aproximadamente 450.000 e consiste numa cobertura de proteína à volta de um núcleo de ferro. Cada molécula de ferritina pode conter um máximo de 4000 átomos de ferro (4). Sob condições normais, tal pode representar 25% do ferro total encontrado no organismo. Além disso, a ferritina pode ser encontrada em vários isómeros (5). Encontram-se concentrações elevadas de ferritina no citoplasma do sistema reticulo-endotelial, fígado, baço e medula óssea (6). Os métodos previamente usados para medir o ferro nestes tecidos são invasivos, causam lesões nos doentes e carecem de uma sensibilidade adequada (7). A medição de ferritina no soro é útil para determinar alterações nas reservas de ferro do organismo e não é invasiva, causando, assim, relativamente pouco desconforto ao doente. Os níveis de ferritina no soro podem ser medidos rotineiramente e são particularmente úteis na detecção precoce da deficiência em ferro, ou anemia, em pessoas aparentemente saudáveis (8,9). As medições séricas da ferritina são também clinicamente significativas na monitorização do estado do ferro nas mulheres grávidas, dadores de sangue e doentes em diálise. Níveis elevados de ferritina podem indicar uma sobrecarga de ferro sem lesões hepáticas aparentes, tal como pode ser observado nos estádios precoces da hemocromatose idiopática (10). Os níveis séricos da ferritina também têm sido usados para avaliar condições clínicas que não estão relacionadas com o armazenamento do ferro, incluindo inflamação, doença hepática crónica e malignidade (11).

3.0 PRINCÍPIO DO ENSAIO

O kit EIAgen Ferritin baseia-se na ligação simultânea da ferritina humana a dois anticorpos monoclonais: um imobilizado em placas de micropoços, o outro conjugado com peroxidase de arborácio (HRP). Após incubação, é realizada a separação da fracção ligada/livre através de uma lavagem de fase sólida simples. A enzima na fracção ligada reage com o substrato (TMB), desenvolvendo uma coloração azul que muda para amarelo após adição da solução de paragem (H₂SO₄). A concentração de ferritina na amostra, é calculada com base numa série de calibradores. A intensidade da cor é proporcional à concentração de ferritina presente na amostra.

4.0 CONTEÚDO DO KIT

4.1 MICROPLACA (CÓDIGO 15PIA)

MTPLATE

1 microplaca, 12x8 poços divisíveis cobertos com anticorpos monoclonais anti-ferritina.
Conserve a 2-8°C.

4.2 CALIBRADORES

6 frascos contendo ferritina do fígado humano com gentamicina a 0,01%, como conservante.
Abra a embalagem da microplaca coberta, apenas quando esta estiver à temperatura ambiente e feche imediatamente após a sua utilização.

Conserve a 2-8°C.

Calibrador	Símbolo	Código	Concentração*	Volume
Calibrador 0	CAL0	15CAL0	0 ng/mL	3 mL
Calibrador 1	CAL1	15CAL1	5 ng/mL	1,0 mL
Calibrador 2	CAL2	15CAL2	20 ng/mL	1,0 mL
Calibrador 3	CAL3	15CAL3	100 ng/mL	1,0 mL
Calibrador 4	CAL4	15CAL4	400 ng/mL	1,0 mL
Calibrador 5	CAL5	15CAL5	1000 ng/mL	1,0 mL

* Concentração aproximada.

Os calibradores foram calibrados de acordo com o 1º Padrão Internacional (IS) da OMS para a ferritina hepática humana 80/602.

4.3 CONJUGADO (código 15HRP)

CONJ|HRP

1 frasco 13 mL contendo anticorpo anti-ferritina conjugado com peroxidase de arborácio (HRP).
Pronto a usar.
Conserve a 2-8°C.

4.4 SUBSTRATO HS (LS.TMB-H202.HK)

SUBS|TMB

1 frasco (13 ml) contendo uma mistura estabilizada de TMB 0, 25g/l (3,3' 5,5'- Tetrametilbenzidina) e H₂O₂ (péroxido de hidrogénio).
Pronto a usar
Conserve a 2-8°C.

4.5 SOLUÇÃO DE PARAGEM (LS.STOP.K)

SOLN|STOP

1 frasco (13 ml) de 0,3 M H₂SO₄.

Pronto a usar

Conserve a 2-8°C

A ficha de segurança MSDS está disponível para ser fornecida ao pessoal laboratorial que assim o solicitar.

4.6 TAMPÃO DE LAVAGEM 20X (cód. TLAVD) WASH|BUF|20X

1 frasco com 50 ml de tampão de lavagem concentrado, contendo 50mM de tampão fosfatado, pH 7,4 e 1g/l Tween 20.

Preparação da solução de trabalho de Tampão de Lavagem: dilua o conteúdo do tampão de lavagem concentrado (50 ml) para 1000 ml, com água destilada.

ARMAZENAMENTO conserve à temperatura ambiente (20-27°C). Estável até ao fim do prazo de validade do kit.

5.0 ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE APÓS A PRIMEIRA ABERTURA

- Os componentes do kit devem ser armazenados a 2-8°C e devem ser protegidos da luz solar.

6.0 MATERIAIS E EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Água destilada
- Distribuidores automáticos.
- Leitor de microplacas capaz de medir as DOs a 450, 405 e 620 nm
- Pipetas de precisão: 0,02 e 0,1 ml
- Pontas de pipeta descartáveis
- Papel absorvente
- Papel gráfico
- Soros de controlo

7.0 ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

7.1 PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

- Os reagentes contêm Proclin 300[®] e Gentamicina como conservantes.
- Evite o contacto com reagentes que contenham peróxido de hidrogénio, ácido sulfúrico e conservantes que podem ser tóxicos, se ingeridos. Não utilize a boca na pipetagem.
- Os calibradores contêm soro humano. A FDA verificou que estes são não reactivos para HbsAg e para os anticorpos anti-HIV; no entanto, estes produtos devem ser manuseados como potencialmente perigosos.
- Siga os regulamentos locais, estaduais e nacionais no que respeita a eliminação de todos os resíduos.

7.2 PRECAUÇÕES TÉCNICAS

- Use da máxima precisão quando diluir e distribuir os reagentes.
- Não utilize reagentes de lotes diferentes.
- Serão obtidos resultados fiáveis e reprodutíveis quando o procedimento do ensaio é efectuado com o total conhecimento das instruções contidas no folheto informativo e em conformidade com as boas práticas de laboratório.
- O procedimento de lavagem é crucial. Uma lavagem insuficiente afecta a precisão e provoca leituras de adsorção erroneamente elevadas.

8.0 COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

A determinação da ferritina pode ser efectuada utilizando soro ou plasma. Se não se realizar a distribuição no espaço de 5 dias da colheita, conserve a amostra a -20°C.

9.0 PROCEDIMENTO DO ENSAIO

9.1 PREPARAÇÃO DO ENSAIO

- Todos os reagentes e amostras devem atingir a temperatura ambiente (18...25°C) e ser devidamente agitados por inversão antes da utilização.
- Todos os reagentes devem ser misturados por inversão suave ou movimentos de rotação, antes da sua utilização. Não crie espuma.
- Uma vez que é necessário realizar o ensaio em duplicado, devem ser preparados dois poços para cada um dos pontos da curva Padrão (calibradores 0-5), dois para cada amostra e um para o Branco.

9.2 PASSOS DA PIPETAGEM E INCUBAÇÃO

- Distribua** 20 µl de cada calibrador e amostra em duplicado, deixando um poço vazio para o branco.
- Distribua** 100 µl de conjugado nos poços dos calibradores e da amostra; não adicione conjugado ao poço do Branco.
- Incube** durante 1 hora a +22-28°C (temperatura ambiente).
- Remova** a mistura de reagente, em seguida **lave** com 0,3 ml de solução de lavagem em cada poço; lave novamente duas vezes para remover completamente o líquido.
- Distribua: 100 µl de substrato em cada poço.**
- Incube** durante 10 minutos no escuro, à temperatura ambiente (22±28°C).
- Distribua:** 100 µl de solução de paragem em cada poço.
- Leia** a densidade óptica, dentro de 30 minutos, a 450 e 405 nm com o filtro de referência definido para 620. Se possível, faça-o automaticamente, ajuste o leitor para zero usando o branco.

10.0 CÁLCULO DE RESULTADOS

10.1 CONTROLO DE QUALIDADE

As boas práticas de laboratório requerem que todos os controlos (controlos baixos, médios e altos) sejam processados. Deve ser testado um número estatisticamente significativo de controlos para a determinação de valores médios e intervalos aceitáveis, de modo a assegurar um desempenho adequado.

10.2 CONVERSÃO DE D.O.

As densidades ópticas (D.O.s) de alguns calibradores e amostras podem ser superiores a 2,0, neste caso, podem estar fora do intervalo de medição do leitor de microplacas. Torna-se, assim, necessário efectuar, para as D.O.s superiores a 2,0, uma leitura a 405 nm (=comprimento de onda do pico de leitura), além de 450 nm (comprimento de onda de pico) e 620 (filtro de referência para a subtração de interferências devido ao plástico).

No caso de leitores de microplacas que não possam realizar a leitura da placa a 3 comprimentos de onda em simultâneo, é aconselhável proceder do seguinte modo:

- Leia a microplaca a 450 nm e a 620 nm.
- Leia novamente a placa a 405 nm e 620 nm.
- Descubra os poços cujas DOs a 450 nm são superiores a 2,0
- Selecione as DOs correspondentes lidas a 405 nm e multiplique estes valores a 405 nm pelo factor de conversão 3,0 (sendo que DO 450/DO 405 = 3,0), isto é: $DO\ 450\ nm = DO\ 405\ nm \times 3,0$

Advertência: O factor de conversão 3,0 é meramente indicativo. Para maior exactidão, recomenda-se que o utilizador calcule o factor de conversão específico para o seu próprio leitor.

10.3 REDUÇÃO DE DADOS – MÉTODO AUTOMÁTICO

Subtraia a D.O. do branco das DOs do calibrador e da amostra.

Use os 4 parâmetros logísticos – de preferência – ou a função “cubic spline” como algoritmo de cálculo.

10.4 REDUÇÃO DE DADOS – MÉTODO MANUAL

- Subtraia a D.O. do branco das DOs do calibrador e da amostra.
- Calcule a média da DO para cada ponto na curva padrão e para cada amostra.
- Desenhe no papel os valores dos calibradores da ferritina e, em seguida, efectue a extrapolação da linha direita.
- Leia as concentrações de ferritina correspondentes aos controlos e amostras.

10.5 INTERVALO DE MEDIÇÃO

O presente método permite a determinação das concentrações de ferritina a partir de 5 ng/ml a 1,000 ng/ml. Use o calibrador zero para diluir as amostras que tenham concentrações > 1,000 ng/ml.

11.0 VALORES ESPERADOS

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo com base na população de doentes.

Os valores plasmáticos da ferritina estão incluídos nos seguintes intervalos:

Número de doentes	Média (ng/ml)	Intervalo (ng/ml)
Mulheres férteis: 50	53	6 - 180
Mulheres na pós-menopausa: 30	105	8 - 350
Homens: 50	175	20 - 400

12.0 LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- Não foi observado qualquer “efeito de gancho” até 50,000 ng/ml de ferritina, com o presente método.
- Não foram observadas com o presente método, quaisquer interferências causadas por factores reumatóides, bilirrubina, hemoglobina, colesterol e triglicéridos.
- Para fins diagnósticos, os resultados obtidos por este teste devem ser usados em conjunto com outros dados (ex: sintomas, resultados de outros testes, impressões clínicas) que o médico possua.

13.0 CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

13.1 PRECISÃO

a) Precisão intra-ensaio.

A precisão intra-ensaio foi determinada com base nas determinações de réplicas de três soros de controlo diferentes, durante o mesmo ensaio. A variabilidade intra-ensaio é apresentada de seguida:

AMOSTRA DE SORO	1	2	3
Número de réplicas	16	16	16
Ferritina média (ng/mL)	15.6	76.1	160.2
Desvio padrão	0.84	2.8	5.2
% CV	5.4	3.7	3.24

b) Precisão inter-ensaios.

A precisão inter-ensaio foi determinada com base nas determinações de réplicas de três soros de controlo diferentes, em dois ensaios diferentes. A variabilidade inter-ensaio é apresentada de seguida:

Amostra de Soro	1	2	3
Número de Réplicas	16	16	16
Ferritina média (ng/mL)	15.4	78.2	165.2
Desvio Padrão	0.88	3.6	6.93
CV%	5.7	4.6	4.2

13.2 RECUPERAÇÃO

Foram dadas a dois doentes quantidades conhecidas e cada vez maiores de ferritina.

A média de recuperação comparada com as concentrações anteriores foi de 98,0%.

	Concentração esperada (ng/ml)	Concentração observada (ng/ml)	% Recuperação
AMOSTRA 1			
Q.adicionada: 18			
50 ng/ml	68.0	65.0	95.6
100 ng/ml	118	122	103.4
200 ng/ml	218	210	96.3
AMOSTRA 2			
Q.adicionada: 128			
50 ng/ml	178	169	94.9
100 ng/ml	228	234	102.6
200 ng/ml	328	317	96.6
AMOSTRA 3			
Q.adicionada: 8.7			
12,5 ng/ml	21.2	22.4	106.2
25 ng/ml	33.7	31.8	94.4
50 ng/ml	58.7	56.4	96.1
100 ng/ml	108.7	105.9	97.4

13.3 LINEARIDADE

Duas amostras de doentes foram diluídas em série com o calibrador zero, para a realização de um estudo de linearidade. A recuperação média foi de 103,5 %.

	Concentração esperada (ng/ml)	Concentração observada (ng/ml)	% Esperada
Amostra 1			
Diluição			
Não diluída		86	
1:2	43.0	45.1	105.4
1:4	21.5	22.1	102.8
1:8	10.75	12.4	107.9
Amostra 2			
Diluição			
Não diluída		128	
1:2	64	65	101.6
1:4	32	30.4	93.7
1:8	16	17.1	106.1

13.4 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS

O kit ELAgen Ferritin foi comparado com outro método comercial RIA (x).

$$Y = 2,8 + 1,06X$$

$$r=0,99$$

13.5 SENSIBILIDADE

Estima-se que a concentração mínima de ferritina humana detectável por este ensaio seja de 1,0 ng/ml.

13.6 ESPECIFICIDADE

A reactividade cruzada dos anticorpos, calculada a 50% de acordo com o método de Abraham, é indicada na tabela abaixo:

Ferritina Iso Fígado	100,0 %
Ferritina Iso Baço	80,0 %
Ferritina Iso Coração	12,0 %

14.0 AUTOMATIZAÇÃO

A Adaltis está disponível para fornecer, mediante pedido, os protocolos de aplicação relativos à automatização adequada nos analisadores de tiras de microtítulos Adaltis (Labotech, Personal Lab e Nexgen) .

15.0 SUGESTÕES PARA RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

O cumprimento do procedimento e das especificações do ensaio, bem como uma utilização correcta dos reagentes e uma pipetagem adequada, ajudará a evitar os seguintes erros.

ERRO	POSSÍVEIS CAUSAS / SUGESTÕES
DO muito diferente (\pm 50%) da DO indicada no CQ	<ul style="list-style-type: none"> - dosagem incorrecta do volume de reagentes (sugestão: verifique a correspondência entre o volume dispensado pela pipeta e o volume necessário ao ensaio; calibre novamente as pipetas) - temperatura incorrecta ou tempo de incubação incorrecto (sugestão: tenha mais cuidado com a manutenção da incubadora; anote o horário de início da incubação) - erro na lavagem ou na leitura do espectrofotómetro (sugestão: verifique o funcionamento ou as definições dos respectivos aparelhos) - contaminação do Substrato ou do Conjugado (sugestão: utilize apenas recipientes de plástico descartáveis e limpos)
Baixos resultados reprodutíveis	<ul style="list-style-type: none"> - dosagem irregular do volume das amostras ou reagentes (sugestão: verifique a precisão das pipetas e a correspondência entre o volume dispensado pela pipeta e o volume necessário ao ensaio; calibre novamente as pipetas) - erro na lavagem ou na leitura (sugestão: verifique o funcionamento ou as definições dos respectivos aparelhos) - contaminação do Substrato (sugestão: utilize apenas recipientes de plástico descartáveis e limpos) - poluição ou degradação dos reagentes (sugestão: utilize pontas adequadas, recipientes de plástico descartáveis e limpos para os reagentes e água destilada ou água equivalente de alta qualidade)
Nenhuma reacção colorimétrica após a adição do substrato	<ul style="list-style-type: none"> - alguns reagentes não foram pipetados - forte contaminação do conjugado ou do Substrato - erros na execução do procedimento do ensaio (ex.: pipetagem acidental dos reagentes numa sequência incorrecta ou a partir do frasco errado, etc.)
Reacção demasiado baixa (D.O.s demasiado baixas)	<ul style="list-style-type: none"> - tempo de incubação demasiado curto, temperatura da incubação demasiado baixa
Reacção demasiado alta (D.O.s demasiado altas)	<ul style="list-style-type: none"> - tempo de incubação demasiado longo, temperatura de incubação demasiado alta - baixa qualidade da água para o tampão de lavagem (baixo grau de desionização) - lavagem insuficiente (conjugados removidos de forma inapropriada)
aspectos inexplicáveis	<ul style="list-style-type: none"> - contaminação das pipetas, pontas ou recipientes - lavagem irregular e insuficiente (conjugados removidos de forma inapropriada)
CV% intra-ensaio demasiado alto	<ul style="list-style-type: none"> - os reagentes e/ou tiras não alcançaram a temperatura ambiente antes da utilização - O sistema de lavagem da placa não está a lavar devidamente (sugestão: limpe a cabeça do sistema de lavagem)
CV% entre ensaios demasiado alto	<ul style="list-style-type: none"> - condições de incubação não constantes (tempo, temperatura) - controlos e amostras não dispensados ao mesmo tempo (com os mesmos intervalos) (verifique a ordem da pipetagem) - variação relacionada com as pessoas intervenientes

16.0 BIBLIOGRAFIA

1. Fairbanks VF, Bentler E. Hematology. Williams, Bentler, Erslev, Rundles, editors. New York:McGraw Hill;1972. p 305-26.
2. Colltrell DB. *Lab Mgmt* 1978 Feb.
3. Jacobs A, Worwood M. *Prog Hematol* 1975;9:1.
4. Forman DT, Vye MV. *Clin Chem* 1980;26(1):145-47.
5. Hazard JT, Yokota M, Arosio P, Drysdale J. *Blood* 1977;49(139).
6. Baur JD, Gradwohls. *Clin Meth and Diag* 1970;22(1):436.
7. Jacobs A. *Fed Proc* 1977;36(7).
8. Schrier S. Hematology. In: Rubenstein E, Federman D, editors. Scientific American. New York: Scientific American Inc.;1980. Chapter V.
9. White D, Kramer D, Johnson G, Dick F, Hamilton H. *A J C P* 1986 Feb.
10. Valberg L. *CMA J* 1980;122:1240.
11. Forman D, Parker S. *Ann Clin Lab Sci* 1980;10:345.
12. Engvall E. Methods in Enzymology. VanVunakis H, Langone JJ, editors. New York:Academic Press;1980. Volume 70;p 419-92.
13. Uotila M, Ruoslahti E, Engvall E. *J Immunol Methods* 1981;42:11-15.
14. Simes MA, Addiego Jr JE, Dallman PR. *Blood* 1974;43:581.
15. Walter G.O., Miller F.W., Wer wood, M. J. Clin. Path . 29 770 - 772 (1973)
16. Watanabe, N. Niitsu, Y. Ohtsuka, S. Kosaki, J. Kohgo, Y. Urushisaki, I. Kato, K. Ishikawa, E. Clin. Chem.,25/1 , 80 - 82 (1979).
17. Van Oost, S.A. Willekens, F.L.A., B.R. Van Neebors, B.R., Van Den Beld, B. Clin. Chem ,28/12 ,2429 - 2433 (1982).
18. Ronald H, Ng. Brown, A.B. Valdes JR. Clin. Chem 29/6, 1109 - 1113 (1983)