

Instructions for Use

Ferritin ELISA

IVD



REF EIA-4408

Σ 96



DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße 18, 35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.
Por favor, usar a versão válida das instruções de utilização fornecidas com o kit.**

Introduced modifications / Durchgeführte Änderungen / Modifiche introdotte / Modificaciones introducidas / Modifications apportées / Modificações introduzidas	
The following changes have been made in comparison to the previous version: Im Vergleich zur Vorgängerversion wurden folgende Änderungen vorgenommen: Rispetto alla versione precedente, sono state apportate le seguenti modifiche: Se han introducido los siguientes cambios en comparación con la versión anterior: Les modifications suivantes ont été apportées par rapport à la version précédente : Foram efetuadas as seguintes alterações em comparação com a versão anterior:	
Detailed editorial revision. Ausführliche redaktionelle Überarbeitung. Revisione editoriale dettagliata. Revisión editorial detallada. Révision éditoriale détaillée. Revisão editorial detalhada.	
1 INTENDED PURPOSE:	Indication of clinical use
1.1 CLINICAL SIGNIFICANCE:	Added
4 WARNINGS:	Updated
3.1 Reagents and materials supplied in the kit:	Enzyme Conjugate volume increased to 21 mL (before: 12 mL)
8.1 Preparation of Calibrators and Controls:	Concentration for Standard 5 has changed to 800 ng/mL (before: 1000 ng/mL);
8.4 Procedure:	Pipetting volume for standards/samples decreased to 10 µL (before: 20 µL), Pipetting volume for conjugate increased to 200 µL (before: 100 µL), Incubation time for substrate increased to 15 minutes (before: 10 minutes);
9 QUALITY CONTROL:	Updated
11 METROLOGY AND TRACEABILITY	Standardised against internal reference standards (serum matrix) (before: calibrated against the WHO 1 st IS Ferritin 80/602).
13 EXPECTED VALUES:	Updated data determined during assay validation:
14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS:	Updated and additional data.
18 BIBLIOGRAPHY:	Updated

ENGLISH.....	2
DEUTSCH.....	8
ITALIANO.....	12
ESPAÑOL.....	18
BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / LITERATUR.....	24
SYMBOLS USED.....	25

1 INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use

For Laboratory Professional Use

Ferritin ELISA is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of ferritin in human serum or plasma.

Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data as an aid in the diagnosis of diseases affecting iron metabolism.

1.1 CLINICAL SIGNIFICANCE

Ferritin is a protein mainly present in the cytoplasm but also found in serum and plasma as an iron-carrier protein. It contains, stores and releases iron in a controlled fashion. One molecule of ferritin is capable of binding between 4000 and 5000 atoms of iron, making ferritin the major iron storage protein for the body^{1,2}.

Iron is an essential micronutrient as it is required for an adequate erythropoietic function, oxidative mechanism and cellular immune response^{1,2,3}. Under physiologic conditions there is a balance between iron absorption, iron transport and iron storage in the human body. When this balance is interrupted, two main conditions may present: iron deficiency and iron overload^{1,2,4}. In humans, ferritin acts as a buffer against iron deficiency and overload.

Iron deficiency is the most common and widespread nutritional disorder in the world, affecting 2 billion people and in particular children, women of childbearing age with heavy menstrual flow and miscarriages, and premenopausal women. The WHO estimates that 30% of nonpregnant and 42% of pregnant women are affected by iron deficiency and anemia⁵⁻¹⁰.

Since the concentration of ferritin is directly proportional to the total iron stores in the body, serum ferritin concentrations are considered as a common diagnostic tool in the diagnosis of diseases affecting iron metabolism¹.

In addition to ferritin levels additional markers assessed as part of the routine diagnosis of iron deficiency are transferrin saturation and the assessment of haemoglobin levels. All these parameters should also be considered together with other parameters such as the familial history of the patients and the evaluation of clinical symptoms.

2 PRINCIPLE OF THE METHOD

The Ferritin ELISA is based on simultaneous binding of human Ferritin to two monoclonal antibodies, one immobilised on the microwell plate and the other conjugated with horseradish peroxidase (HRP).

After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid phase washing. Then, the enzyme HRP in the bound fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added. The colour intensity is proportional to the ferritin concentration of in the sample.

Ferritin concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3 REAGENTS, MATERIALS, AND INSTRUMENTATION

3.1 Reagents and materials supplied in the kit

1. **Zero Standard** (1 vial) 3 mL and **Standard (Standard 1 - 5)**, 5x (1 vial = 1 mL)
2. **Ferritin Control** (1 vial) 1 mL
Control concentration is indicated on the Certificate of Analysis
3. **Enzyme Conjugate** (1 vial) 21 mL
Anti-Ferritin antibody conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)
4. **Microtiterwells** (1 microplate breakable)
Anti-Ferritin antibody adsorbed on microplate
5. **Substrate Solution** (1 vial) 15 mL
H₂O₂-TMB 0.26 g/L (*avoid any skin contact*)
6. **Stop Solution** (1 vial) 15 mL
Sulphuric acid 0.15 mol/L (*avoid any skin contact*)
7. **Wash Solution** 10X (1 vial) 50 mL
Phosphate buffer 0.2 M, pH 7.4

3.2 Materials required but not provided

Distilled water

3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Precision Pipetting Devices

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

4 WARNINGS

- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of ProClin™ 300 as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5 PRECAUTIONS

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

6 REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 °C - 8 °C in the dark.

The kit is stable at 2 °C - 8 °C until the expiry date stated on the external kit label.

Once opened, the kit is stable at 2 °C - 8 °C for 5 months.

The diluted wash solution is stable for 30 days at 2 °C - 8 °C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

7 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) samples.

Sample Storage	Duration
2 – 8 °C	72 hours
Freeze/thaw cycles	3 cycles

8 PROCEDURE

8.1 Preparation of Calibrators and Controls

The calibrators are ready to use and are provided at the following concentrations:

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
ng/mL	0	5	20	100	400	800

The Control is ready to use.

8.2 Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial “Wash Solution” with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio.

It is possible to observe the presence of crystals within the concentrated wash solution; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals. For greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care also to transfer crystals completely by rinsing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

8.3 Preparation of Samples

Ferritin determination should be performed with human serum or plasma.

8.4 Procedure

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

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Sample/ Control		10 µL	
Standard S0 – S5	10 µL		
Conjugate	200 µL	200 µL	
Incubate for 1 hour at room temperature (22 °C - 28 °C). Remove the content from each well. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each manual washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 15 minutes at room temperature (22 °C - 28 °C) in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620 - 630 nm or against Blank within 5 minutes.			

9 QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit control provided in the kit should be tested as unknown and is intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

The mean concentration of the control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

DRG recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories¹².

10 CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A cubic spline or 4-parameter logistic (4PL) curve fit, **including Calibrator 0 is recommended.**

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Calibrator 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

11 MEASURING RANGE

The assay measuring range (AMR) is 2.84 – 800 ng/mL.

Any value that reads below 2.84 ng/mL should be reported as “< 2.84 ng/mL”. Any value that reads above 800 ng/mL should be reported as “> 800 ng/mL”.

12 METROLOGY AND TRACEABILITY

The Ferritin ELISA has been standardised against internal reference standards (serum matrix) which have been value assigned to another commercially available test method.

13 EXPECTED VALUES

The following ranges were determined using the Ferritin ELISA and are provided for information only. The 95% reference interval for apparently healthy adults were calculated by a non-parametric method following guidance from CLSI C28-A3 “Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory”.

	n	Median (ng/mL)	Reference interval (ng/mL)
Women			
Pre-menopausal	42	33.5	8.4– 156.9
Post-menopausal	42	44.8	16.8 – 180.8
Men	84	122.5	21.7 – 276.4

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

14.1 Detection Capability

The limit of blank (LoB), limit of detection (LoD) and limit of quantitation (LoQ) were determined with guidance from CLSI EP17-A, “Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation” using 6 blanks and 6 low level samples.

Sensitivity	Concentration
Limit of Blank (LoB)	0.35 ng/mL
Limit of Detection (LoD)	2.00 ng/mL
Limit of Quantitation (LoQ)	2.84 ng/mL

14.2 Trueness

Trueness has been demonstrated through method comparison of the Ferritin ELISA to a commercially available assay using native donor samples – refer to section 15.5

14.3 Precision

Precision of the Ferritin ELISA was determined by performing a complex precision study.

Repeatability: A total of 6 serum samples were assayed in five replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Data from one representative lot is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (ng/mL)	Within run (Repeatability)	
			SD	CV
1	75	9.21	1.23	13.3%
2	75	68.30	2.47	3.6%
3	75	178.38	9.44	5.3%
4	75	380.97	26.54	7.0%
5	75	467.72	25.58	5.5%
6	75	619.17	51.33	8.3%

Reproducibility: A total of 6 serum samples were assayed in five replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Results for the combined data from two lots is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (ng/mL)	Within Laboratory (Reproducibility)	
			SD	CV
1	150	8.96	1.21	13.5%
2	150	67.85	4.31	6.4%
3	150	177.92	14.14	7.9%
4	150	377.41	32.10	8.5%
5	150	460.17	46.83	10.2%
6	150	614.18	75.43	12.3%

14.4 Linearity

Linearity was evaluated based on CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". For ferritin concentration by Ferritin ELISA, the measurement procedure shows linearity for the interval from 2.5 to 849 ng/mL within the allowable deviation of linearity (ADL) of $\pm 15\%$.

14.5 Method comparison

The Ferritin ELISA was compared against a commercially available quantitative automated ferritin assay, following CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". A total of 100 samples, selected to represent a wide range of ferritin concentrations [15.65 to 782 ng/mL], were assayed by each method. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

n	Slope [95% CI]	Intercept (ng/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
100	0.96 [0.92 – 1.01]	0.24 [-5.46 – 3.07]	0.96

14.6 Analytical Specificity

The following substances do not interfere with a bias of $> \pm 15\%$ in the Ferritin ELISA when the concentrations are below the stated threshold presented in the following table.

Potentially Interfering Reagent	Threshold Concentration
Bilirubin, conjugated	15 mg/dL
Bilirubin, unconjugated	15 mg/dL
Haemoglobin	1000 mg/dL
Total Protein	10 g/dL
Triglyceride	3000 mg/dL

14.7 Serum-plasma study

The Ferritin ELISA matrix comparison study was performed to evaluate the difference across tube types (serum separator tubes (SST), lithium heparin plasma, sodium heparin plasma and K2 EDTA plasma) versus the control samples (red top serum, without additive) following CLSI EP9-A3 guidelines. A total of 20 samples covering the assay range were evaluated. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

Sample type	Slope [95% CI]	Intercept (ng/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
SST	1.02 [0.99 – 1.25]	-1.02 [-4.98 – 0.28]	1.00
Lithium Heparin	1.04 [0.95 – 1.09]	-1.61 [-3.33 – 0.42]	1.00
Sodium Heparin	1.07 [0.98 – 1.21]	-1.92 [-4.51 – -0.22]	1.00
EDTA	0.97 [0.88 – 1.06]	-1.02 [-3.24 – 0.66]	1.00

14.8 Hook effect

No hook effect was observed with the Ferritin ELISA up to 10 000 ng/mL.

15 LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with in vitro immunoassays¹³. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.

16 WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

17 PRODUCT COMPLAINTS

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime; if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority.

1 ZWECKBESTIMMUNG

Für den Einsatz in der In-vitro Diagnostik.

Für den beruflichen Gebrauch in Laboratorien.

Der Ferritin-ELISA ist ein manuelles In-vitro-Diagnostikum für die quantitative Bestimmung von Ferritin in Humanserum oder -plasma.

Die Ergebnisse sind in Verbindung mit anderen Klinik- und Labordaten als diagnostisches Hilfsmittel bei Krankheiten, die den Eisenstoffwechsel beeinflussen, zu verwenden.

2 TESTPRINZIP

Der Ferritin ELISA basiert auf der gleichzeitigen Bindung von humanem Ferritin an zwei monoklonale Antikörper, von denen der eine auf der Mikrotiterplatte fixiert und der andere mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist.

Nach der Inkubation werden gebundenes und freies Antigen durch einfach durchzuführendes Waschen der festen Phase getrennt.

Dann reagiert das mit HRP konjugierte Enzym in der gebundenen Fraktion mit dem Substrat (H_2O_2) und dem TMB-Substrat und entwickelt eine blaue Färbung, die sich nach gelb verändert, wenn die Stopplösung (H_2SO_4) hinzugefügt wird.

Die Intensität der Färbung ist proportional zur Ferritinkonzentration in der Probe.

Die Ferritinkonzentration in der Probe wird mit einer Standardkurve berechnet.

3 REAGENZIEREN, MATERIALIEN UND GERÄTEAUSSTATTUNG

3.1 Im Kit enthaltene Reagenzien und Materialien

1. Ferritin **Zero Standard (Nullstandard)** (1 Fläschchen) 3 mL und Ferritin **Standard (Standard 1 - 5)**, 5x (1 Fläschchen = 1 mL)
2. Ferritin **Control (Kontrolle)** (1 Fläschchen) 1 mL
Die Konzentration der Kontrolle ist auf dem Analysenzertifikat angegeben.
3. **Enzyme Conjugate (Enzymkonjugat)** (1 Flasche) 21 mL
Anti-Ferritin-Antikörper konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)
4. **Mikrotiterwells** (1 Mikrotiterplatte zum Auseinanderbrechen)
Anti-Ferritin-Antikörper an die Mikrotiterplatte gebunden
5. **Substrate Solution (Substratlösung)** (1 Flasche) 15 mL
 H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (Hautkontakt vermeiden)
6. **Stop Solution (Stopplösung)** (1 Flasche) 15 mL
Schwefelsäure 0,15 mol/L (Hautkontakt vermeiden)
7. **Wash Solution (Waschlösung)** 10-fach konzentriert (1 Flasche) 50 mL
Phosphatpuffer 0,2 M, pH 7,4

3.2 Nicht im Kit enthaltene erforderliche Reagenzien

Destilliertes Wasser.

3.3 Erforderliche Hilfsmittel und Geräteausstattung

Pipettierautomat

Präzisionspipettien

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

4 WARNHINWEISE

- Dieses Testkit ist nur für In-vitro-Diagnostik zur Anwendung durch Fachpersonal bestimmt. Nicht zur inneren oder äußeren Anwendung bei Mensch oder Tier geeignet.
- Beim Arbeiten mit den enthaltenen Reagenzien geeignete persönliche Schutzausrüstung verwenden.
- Beim Arbeiten mit Blutprodukten die GLP- („Good laboratory practice“) Richtlinien befolgen.
- Das für die Herstellung des Kits verwendete Material tierischen Ursprungs stammt von Tieren, die als gesund zertifiziert wurden, und das Rinderprotein wurde aus Ländern bezogen, die nicht von einer BSE-Infektion betroffen sind; dennoch sollten diese Materialien als potenziell infektiös behandelt werden.
- Manche Reagenzien enthalten kleine Mengen an ProClin™ 300 als Konservierungsmittel. Kontakt mit der Haut oder Schleimhaut vermeiden.
- Das TMB-Substrat enthält eine reizende Substanz, die beim Einatmen, Verschlucken oder der Aufnahme über die Haut gesundheitsschädlich sein kann. Um eine Schädigung zu verhindern, Einatmen, Verschlucken oder Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure. Schwefelsäure ist giftig und ätzend und kann bei Einnahme toxisch sein. Um Verätzungen zu verhindern, Kontakt mit der Haut oder den Augen vermeiden.

- Reagenz TMB/H₂O₂ keinem direkten Sonnenlicht, Metallen oder Oxidationsmitteln aussetzen. Die Lösung nicht einfrieren.

5 VORSICHTSMASSNAHMEN

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

6 LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN

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

Der Kit ist bei 2 °C - 8 °C bis zu dem auf dem Außenetikett des Kits angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Nach dem Öffnen ist der Kit bei 2 °C bis 8 °C 5 Monate lang haltbar.

Die verdünnte Waschlösung ist 30 Tage bei 2 °C bis 8 °C haltbar.

Wichtige Hinweise: Den Beutel mit der beschichteten Mikrotiterplatte erst öffnen, wenn er Raumtemperatur angenommen hat und sofort nach Gebrauch wieder verschließen.

7 PROBENENTNAHME UND -LAGERUNG

Der Test sollte unter Verwendung von **Serum-** (Standardprobenröhrchen (SST) oder Röhrchen mit Serumtrenngel) oder **Plasmaproben** (Lithium-Heparin, Natrium-Heparin oder Kalium-EDTA) durchgeführt werden.

Probenlagerung	Dauer
2 °C – 8 °C	72 Stunden
Einfrier-/Auftauzyklen	3 Zyklen

8 TESTDURCHFÜHRUNG

8.1 Vorbereitung der Standards und Kontrollen

Die Standards sind gebrauchsfertig. Sie haben folgende Konzentrationen:

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
ng/mL	0	5	20	100	400	800

Die Kontrollen sind gebrauchsfertig.

8.2 Vorbereitung der Waschlösung

Der Inhalt jeder Flasche der konzentrierten Waschlösung (10X) muss vor der Verwendung mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 500 mL aufgefüllt werden. Bei kleineren Volumina entsprechend im Verhältnis 1:10 verdünnen.

Möglicherweise sind in der konzentrierten Waschlösung Kristalle sichtbar, in diesem Fall bei Raumtemperatur mischen, bis sich die Kristalle vollständig aufgelöst haben. Um die Genauigkeit zu erhöhen, den gesamten Inhalt der Flasche mit konzentrierter Waschlösung auf 500 mL auffüllen und dabei darauf achten, dass auch die Kristalle mit übertragen werden, anschließend mischen, bis sich die Kristalle vollständig aufgelöst haben.

8.3 Vorbereitung der Proben

Die Ferritinbestimmung sollte mit Humanserum oder -plasma durchgeführt werden.

8.4 Testdurchführung

- **Alle Reagenzien müssen für mindestens 30 Minuten Raumtemperatur annehmen (22 °C bis 28 °C).** Am Ende der Testdurchführung die Reagenzien sofort wieder bei 2 °C bis 8 °C lagern, längere Zeiten bei Raumtemperatur möglichst vermeiden.
- Nicht verwendete beschichtete Mikrotiter-Streifen müssen wieder zusammen mit dem beigefügten Trockenmittel in den Folienbeutel zurückgelegt werden, der Beutel muss fest verschlossen und bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.
- Damit keine mikrobielle oder chemische Kontamination auftreten kann, nicht verwendete Reagenzien nicht wieder in das Originalfläschchen zurückfüllen.
- Da der Test zur Erhöhung der Genauigkeit der Testergebnisse als Doppelbestimmung durchgeführt wird, für jeden Punkt der Standardkurve (S0-S5) zwei Vertiefungen, für jede Kontrolle und jede Probe ebenfalls zwei Vertiefungen und für den Nullwert eine Vertiefung vorbereiten.

Reagenz	Standard	Probe/ Kontrolle	Nullwert
Probe/Kontrolle		10 µL	
Standard S0-S5	10 µL		
Konjugat	200 µL	200 µL	
1 Stunde bei Raumtemperatur (22 °C bis 28 °C) inkubieren. Inhalt der Vertiefungen entfernen. Die Vertiefungen 3-mal mit 300 µL verdünnter Waschlösung waschen. Wichtiger Hinweis: bei jedem manuellen Waschschrift die Platte 5 Sekunden vorsichtig schütteln. Überschüssige Flüssigkeit durch Aufschlagen der umgedrehten Platte auf saugfähigem Papier entfernen. Waschautomat: Bei Verwendung eines Waschautomaten die Vertiefungen mindestens 5-mal waschen.			
TMB-Substrat	100 µL	100 µL	100 µL
15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (22 °C bis 28 °C) inkubieren.			
Stopplösung	100 µL	100 µL	100 µL
Die Mikrotiterplatte vorsichtig schütteln. Die Absorption (E) innerhalb von 5 Minuten bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge von 620 - 630 nm oder gegen den Nullwert messen.			

9 QUALITÄTSKONTROLLE

Die gute Laborpraxis (GLP) erfordert die Verwendung von Qualitätskontrollproben in jeder Testreihe, um die Leistungsfähigkeit des Tests zu überprüfen. Die Kontrollen sind wie unbekannte Proben zu behandeln und die Ergebnisse mit geeigneten statistischen Methoden zu analysieren.

Die im Kit bereitgestellte Kontrolle sollte als unbekannte Probe getestet werden und soll dazu dienen, die Gültigkeit der mit jeder Testplatte erzielten Ergebnisse zu beurteilen.

Der Mittelwert der Konzentration der Kontrolle wird in dem QC-Bericht dokumentiert, der jedem Kit beiliegt. Diese mittleren Konzentrationen werden über mehrere Assays ermittelt, die an mehreren Stellen auf jeder Platte in Doppelbestimmung durchgeführt werden.

DRG empfiehlt den Anwendern, grafische Darstellungen der Kontrollwerte zu führen, die mit jedem Assay-Lauf erzeugt werden, einschließlich der laufenden Mittelwerte, SDs und %CVs. Diese Informationen erleichtern die Trendanalyse der Kontrollen in Bezug auf die Leistung der aktuellen und historischen Kontrollchargen im Vergleich zu den gelieferten Qualitätskontrolldaten. Die Trendanalyse hilft bei der Identifizierung von Assays, die Kontrollwerte liefern, die signifikant von ihrem Durchschnittsbereich abweichen.

Bei der Interpretation der Kontrolldaten sollten die Benutzer beachten, dass dieses Produkt als manuelles Produkt konzipiert und entwickelt wurde. Der auf dem QC-Zertifikat angegebene Bereich sollte für Assays geeignet sein, die manuell und unter strikter Einhaltung des oben beschriebenen Assay-Verfahrens durchgeführt werden. Fachleute für Qualitätskontrolle sind sich darüber im Klaren, dass es aufgrund unterschiedlicher Bedingungen und Arbeitsweisen immer Schwankungen bei den Mittelwerten und der Präzision von Kontrollmessungen zwischen verschiedenen Labors geben wird¹².

10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Es stehen verschiedene Softwarepakete zur Datenverarbeitung zur Verfügung, die zur Erstellung der mittleren Standardkurve und zur Berechnung der mittleren Konzentrationen der unbekanntenen Proben und Kontrollen verwendet werden können. Empfohlen wird eine kubische Spline-Kurve oder eine logistische 4-Parameter-Kurve (4PL), **einschließlich Standard 0**.

Alternativ kann eine Standardkurve auf semilogarithmischem Papier erstellt werden, indem die mittlere Absorption auf der Y-Achse gegen die Konzentration des Analyten auf der X-Achse aufgetragen wird. Der Kalibrator 0 sollte in der Standardkurve enthalten sein. Lesen Sie den mittleren Absorptionswert jeder unbekanntenen Probe an der Kurve ab.

11 MESSBEREICH

Der Assay-Messbereich (AMR) beträgt 2,84 - 800 ng/mL.

Jeder Wert, der unter 2,84 ng/mL liegt, sollte als "< 2,84 ng/mL" angegeben werden. Jeder Wert, der über 800 ng/mL liegt, sollte als "> 800 ng/mL" angegeben werden.

12 METROLOGIE UND RÜCKVERFOLGBARKEIT

Der Ferritin ELISA wurde anhand interner Referenzstandards (Serummatrix) standardisiert, deren Werte einer anderen kommerziell erhältlichen Testmethode zugeordnet wurden.

13 ERWARTETE WERTE

Die folgenden Bereiche wurden mit dem Ferritin-ELISA bestimmt und werden nur zur Information bereitgestellt. Die 95 %-Referenzintervalle für scheinbar gesunde Erwachsene wurden mit einer nichtparametrischen Methode berechnet, die den Leitlinien von CLSI C28-A3 "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory" folgt.

	n	Median (ng/mL)	Referenzintervall (ng//mL)
Frauen			
Pre-menopausal	42	33.5	8.4– 156.9
Post-menopausal	42	44.8	16.8 – 180.8
Männer	84	122.5	21.7 – 276.4

Die oben genannten Bereiche sollten nur als Richtlinien betrachtet werden; es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen erwarteten Bereich auf der Grundlage seiner eigenen Patientenpopulation festlegt.

14 TESTCHARAKTERISTIKA

Daten hierzu entnehmen Sie bitte der englischen Gebrauchsanweisung.

15 GRENZEN DER ANWENDUNG

- Wie bei jedem diagnostischen Verfahren müssen die Ergebnisse in Verbindung mit dem klinischen Bild des Patienten und anderen dem Arzt vorliegenden Informationen interpretiert werden.
- Die Leistungsmerkmale dieses Assays wurden nicht in einer pädiatrischen Population ermittelt.
- Heterophile Antikörper im Humanserum können mit Reagenz-Immunglobulinen reagieren und In-vitro-Immunoassays stören¹³. Bei Patienten, die routinemäßig mit Tieren oder tierischen Serumprodukten in Kontakt kommen, kann es zu dieser Interferenz kommen, und es können anomale Werte beobachtet werden.

16 ENTSORGUNG

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

17 PRODUKT-REKLAMATIONEN

Für Patienten/Anwender/Dritte in der Europäischen Union und in Ländern mit ähnlichen gesetzlichen Bestimmungen: Wenn während der Verwendung dieses Produkts oder als Folge seiner Verwendung ein schwerwiegender Zwischenfall aufgetreten ist, melden Sie dies bitte dem Hersteller und/oder seinem bevollmächtigten Vertreter sowie Ihrer nationalen Aufsichtsbehörde.

1 SCOPO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro*

Per uso professionale in laboratorio

Ferritin ELISA è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione quantitativa di ferritina nel siero o nel plasma umano.

I risultati devono essere impiegati in associazione ad altri dati clinici e di laboratorio come ausilio nella diagnosi di patologie che influenzano il metabolismo del ferro.

1.1 RILEVANZA CLINICA

La ferritina è una proteina presente principalmente nel citoplasma, ma si trova anche nel siero e nel plasma come proteina che trasporta il ferro. Contiene, accumula e rilascia il ferro in modo controllato. Una molecola di ferritina è in grado di legare tra 4.000 e 5.000 atomi di ferro, rendendo la ferritina la principale proteina di stoccaggio del ferro per il corpo^{1,2}.

Il ferro è un micronutriente essenziale in quanto è necessario per una funzione eritropoietica, un meccanismo ossidativo e una risposta immunitaria cellulare adeguati^{1,2,3}. In condizioni fisiologiche esiste un equilibrio tra l'assorbimento, il trasporto e lo stoccaggio del ferro nel corpo umano. Quando questo equilibrio viene interrotto, si possono presentare due condizioni principali: carenza di ferro ed eccesso di ferro^{1,2,4}. Negli esseri umani, la ferritina agisce come tampone contro la carenza e l'eccesso di ferro.

La carenza di ferro è il disturbo nutrizionale più comune e diffuso nel mondo, che colpisce 2 miliardi di persone, in particolare i bambini, le donne in età fertile con flusso mestruale abbondante e aborti, e le donne in premenopausa. L'OMS stima che il 30% delle donne non in stato di gravidanza e il 42% delle donne incinte sono affette da carenza di ferro e anemia⁵⁻¹⁰.

Poiché la concentrazione di ferritina è direttamente proporzionale alle riserve totali di ferro nel corpo, le concentrazioni di ferritina sierica sono considerate come uno strumento diagnostico comune nella diagnosi di malattie che interessano il metabolismo del ferro¹.

Oltre ai livelli di ferritina, altri marcatori valutati come parte della diagnosi di routine di carenza di ferro sono la saturazione della transferrina e la valutazione dei livelli di emoglobina. Inoltre, tutti questi parametri devono essere considerati insieme ad altri parametri come l'anamnesi familiare dei pazienti e la valutazione dei sintomi clinici.

2 PRINCIPIO DEL METODO

Il test Ferritin ELISA si basa sul legame simultaneo della ferritina umana a due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato sulla piastra del micropozzetto e l'altro coniugato con perossidasi di rafano (HRP).

Dopo l'incubazione, la separazione del legato dal libero viene eseguita con un semplice lavaggio della fase solida. Quindi, l'enzima HRP nella parte libera reagisce con il substrato (H₂O₂) e il substrato TMB e sviluppa un colore blu che cambia in giallo quando viene aggiunta la soluzione di arresto (H₂SO₄). L'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione di ferritina nel campione.

La concentrazione di ferritina nel campione viene calcolata attraverso una curva di calibrazione.

3 REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1 Reagenti e materiali forniti nel kit

1. **Zero Standard S0** (1 fiale) 3 mL e Ferritina **Standard (Standard 1 - 5)**, 5x (1 flacone = 1 mL)
2. Ferritin **Control** (Controllo) (1 fiala) 1 mL
La concentrazione di controllo è indicata sul Certificato di analisi.
3. **Enzyme Conjugate** (Coniugato) (1 fiala) 21 mL
Anticorpo anti-ferritina coniugato con perossidasi di rafano (HRP)
4. **Microtiterwells** (Micropiastra rivestita) (1 micropiastra frangibile)
Anticorpo anti-ferritina adsorbito su micropiastra
5. **Substrate Solution** (Substrato TMB) (1 fiala) 15 mL
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitare qualsiasi contatto con la pelle*)
6. **Stop Solution** (Soluzione di arresto) (1 fiala) 15 mL
Acido Solforico 0,15 mol/L (*evitare qualsiasi contatto con la pelle*)
7. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio conc.)10X (1 fiala) 50 mL
Tampone fosfato 0,2M, pH 7.4

3.2 Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

3.3 Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico

Pipette di precisione

Letto di micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

4 AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di ProClin™ 300 come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- Il substrato TMB contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito per via cutanea. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con pelle e occhi.
- La soluzione di arresto consiste in una soluzione diluita di acido solforico. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire ustioni chimiche, evitare il contatto con pelle e occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5 PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2 °C - 8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente testato.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6 CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2 °C - 8 °C, al buio.

Il kit è stabile a 2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.

Una volta aperto, il kit è stabile a 2 °C - 8 °C per 5 mesi.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2 °C - 8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastra rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

7 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su campioni di siero (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o plasma (litio eparina, sodio eparina o EDTA di potassio).

Conservazione dei campioni	Durata
2 °C - 8 °C	72 ore
Cicli di congelamento/scongelamento	3 cicli

9 PROCEDURA

9.1 Preparazione di calibratori e controlli

I calibratori sono pronti per l'uso e sono forniti alle seguenti concentrazioni:

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
ng/mL	0	5	20	100	400	800

Il controllo è pronto per l'uso.

9.2 Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Wash Solution" (Soluzione di lavaggio conc. 10X) con acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:10.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura anche di trasferire completamente i cristalli sciacquando il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

9.3 Preparazione dei campioni

La determinazione della ferritina deve essere eseguita con siero o plasma umano.

9.4 Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2 °C - 8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2 °C - 8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati del test, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (S0 - S5), due per ogni controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campione / Controllo	Bianco
Campione/Controllo		10 µL	
Calibratore S0 - S5	10 µL		
Coniugato	200 µL	200 µL	
Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (22 - 28 °C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto. Lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita. Nota importante: durante ogni fase di lavaggio manuale, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente. Lavatore automatico: se si utilizzano apparecchiature automatiche, lavare i pozzetti almeno 5 volte.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (22 - 28 °C) al buio.			
Soluzione di arresto	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o contro il bianco entro 5 minuti.			

10 CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

Il controllo fornito nel kit deve essere testato come se fosse sconosciuto e ha lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media del livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DRG raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e CV%. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi¹².

11 CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. È consigliato un **adattamento della curva logistica a scanalatura cubica o a 4 parametri (4PL) che includa il calibratore 0**.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbimento medio sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbimento di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

12 INTERVALLO DI MISURAZIONE

L'intervallo di misurazione del test (AMR) è 2,84-800 ng/mL.

Qualsiasi valore inferiore a 2,84 ng/mL deve essere indicato come "< 2,84 ng/mL". Qualsiasi valore superiore 800 ng/mL deve essere indicato come "> 800 ng/mL".

13 METROLOGIA E TRACCIABILITÀ

Il test Ferritin ELISA è stato standardizzato in base a standard interni di riferimento (matrice sierica) il cui valore è stato assegnato a un altro metodo di test disponibile in commercio.

14 VALORI ATTESI

I seguenti intervalli sono stati determinati utilizzando il test Ferritin ELISA e sono forniti unicamente a scopo informativo. Il 95% degli intervalli di riferimento per adulti apparentemente sani è stato calcolato attraverso un metodo non parametrico secondo le linee guida tratte dal documento CLSI C28-A3 "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

	n	Mediana (ng/mL)	Intervallo di riferimento (ng/mL)
Donne			
Pre-menopausa	42	33,5	8,4– 156,9
Post-menopausa	42	44,8	16,8 – 180,8
Uomini	84	122,5	21,7 – 276,4

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

15 CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

15.1 Capacità di rilevamento

Il limite del bianco (LoB), il limite di rilevamento (LoD) e il limite della determinazione quantitativa (LoQ) sono stati definiti basandosi sulla procedura CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" utilizzando 6 bianchi e 6 campioni a basso livello.

Sensibilità	Concentrazione
Limite del bianco (LoB)	0,35 ng/mL
Limite di rilevamento (LoD)	2,00 ng/mL
Limite della determinazione quantitativa (LoQ)	2,84 ng/mL

15.2 Esattezza

L'esattezza è stata dimostrata attraverso il confronto del test Ferritin ELISA con un test disponibile in commercio utilizzando campioni di donatori nativi. Fare riferimento alla sezione 15.5.

15.3 Precisione

La precisione del test Ferritin ELISA è stata determinata eseguendo un complesso studio di precisione.

Ripetibilità: un totale di 6 campioni di siero è stato analizzato in cinque repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori. I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (ng/mL)	Intra-test (ripetibilità)	
			DS	CV
1	75	9,21	1,23	13,3%
2	75	68,30	2,47	3,6%
3	75	178,38	9,44	5,3%
4	75	380,97	26,54	7,0%
5	75	467,72	25,58	5,5%
6	75	619,17	51,33	8,3%

Riproducibilità: un totale di 6 campioni di siero è stato analizzato in cinque repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori. I risultati per i dati combinati di due lotti sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (ng/mL)	All'interno del laboratorio (riproducibilità)	
			DS	CV
1	150	8,96	1,21	13,5%
2	150	67,85	4,31	6,4%
3	150	177,92	14,14	7,9%
4	150	377,41	32,10	8,5%
5	150	460,17	46,83	10,2%
6	150	614,18	75,43	12,3%

15.4 Linearità

La linearità è stata valutata in base a CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Per la concentrazione di ferritina mediante il test Ferritin ELISA, la procedura di misurazione mostra linearità per l'intervallo da 2,5 a 849 ng/mL entro la deviazione ammissibile di linearità (ADL) di $\pm 15\%$.

15.5 Confronto del metodo

Il test Ferritin ELISA è stato confrontato con un dosaggio della ferritina automatico quantitativo disponibile in commercio, seguendo CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Un totale di 100 campioni, selezionati per rappresentare un vasto intervallo di concentrazioni di ferritina [15,65-782 ng/mL] è stato dosato con entrambi i metodi. L'analisi di regressione di Passing-Bablok è stata effettuata su dati comparativi:

n	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (ng/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
100	0,96 [0,92-1,01]	0,24 [-5,46-3,07]	0,96

15.6 Specificità analitica

Le seguenti sostanze non interferiscono con un bias $> \pm 15\%$ nel test Ferritin ELISA quando le concentrazioni sono inferiori alla soglia dichiarata presentata nella tabella seguente.

Reagente potenzialmente interferente	Concentrazione di soglia
Bilirubina, coniugata	15 mg/dL
Bilirubina, non coniugata	15 mg/dL
Emoglobina	1.000 mg/dL
Proteine totali	10 g/dL
Trigliceridi	3.000 mg/dL

15.7 Studio su siero-plasma

È stato condotto uno studio di confronto tra matrici del test Ferritin ELISA per valutare la differenza tra i tipi di provette (provette per la separazione del siero (SST), per plasma in litio eparina, per plasma in sodio eparina e plasma in K2 EDTA) rispetto ai campioni di controllo (siero tappo rosso, senza additivo) secondo le linee guida CLSI EP9-A3. È stato valutato un totale di 20 campioni che coprivano l'intervallo del test. L'analisi di regressione di Passing-Bablok è stata effettuata su dati comparativi:

Tipo di campione	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (ng/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
SST	1,02 [0,99–1,25]	-1,02 [-4,98–0,28]	1,00
Litio eparina	1,04 [0,95–1,09]	-1,61 [-3,33–0,42]	1,00
Sodio eparina	1,07 [0,98–1,21]	-1,92 [-4,51–0,22]	1,00
EDTA	0,97 [0,88–1,06]	-1,02 [-3,24–0,66]	1,00

15.8 Effetto hook

Nessun effetto hook è stato osservato con il test Ferritin ELISA fino a 10 000 ng/mL.

16 LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*¹³. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

17 GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

18 RECLAMI SUI PRODOTTI

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile; se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

1 FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

Ferritin ELISA es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa de la ferritina en suero o plasma humano.

Los resultados deben utilizarse como ayuda en el diagnóstico de enfermedades que afectan al metabolismo del hierro junto con otros datos clínicos y de laboratorio.

1.1 IMPORTANCIA CLÍNICA

La ferritina es una proteína presente principalmente en el citoplasma, pero que también se encuentra en el suero y el plasma como proteína transportadora de hierro. Contiene, almacena y libera el hierro de forma controlada. Una molécula de ferritina es capaz de unir entre 4000 y 5000 átomos de hierro, lo que convierte a la ferritina en la principal proteína de almacenamiento de hierro del organismo^{1,2}.

El hierro es un micronutriente esencial, ya que es necesario para una adecuada función eritropoyética, el mecanismo oxidativo y la respuesta inmunitaria celular^{1,2,3}. En óptimas condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre la absorción, el transporte y el almacenamiento de hierro en el cuerpo humano. Cuando este equilibrio se interrumpe, pueden presentarse dos condiciones principales: la deficiencia de hierro y la sobrecarga de hierro^{1,2,4}. En los seres humanos, la ferritina actúa como un amortiguador contra la deficiencia y la sobrecarga de hierro.

La deficiencia de hierro es el trastorno nutricional más común y extendido en el mundo, que afecta a 2000 millones de personas y, en particular, a niños, a mujeres en edad fértil con flujo menstrual abundante y abortos, y a mujeres premenopáusicas. La OMS estima que el 30 % de las mujeres no embarazadas y el 42 % de las embarazadas se ven afectadas por la deficiencia de hierro y la anemia⁵⁻¹⁰.

Dado que la concentración de ferritina es directamente proporcional al almacenamiento total de hierro en el organismo, las concentraciones de ferritina en suero se consideran una herramienta de diagnóstico habitual para el diagnóstico de las enfermedades que afectan al metabolismo del hierro¹.

Además de los niveles de ferritina, otros marcadores que se evalúan como parte del diagnóstico rutinario de la deficiencia de hierro son la saturación de transferrina y la evaluación de los niveles de hemoglobina. Todos estos parámetros deben considerarse junto con otros parámetros como los antecedentes familiares de los pacientes y la evaluación de los síntomas clínicos.

2 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo Ferritin ELISA se basa en la unión simultánea de la ferritina humana a dos anticuerpos monoclonales, uno inmovilizado en la placa de micropocillos y el otro conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP).

Tras la incubación, la separación ligada/libre se realiza mediante un simple lavado en fase sólida. A continuación, la enzima HRP de la fracción ligada reacciona con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato de TMB, y desarrolla un color azul que cambia a amarillo cuando se añade la solución de detención (H_2SO_4). La intensidad del color es proporcional a la concentración de ferritina de la muestra. La concentración de ferritina en la muestra se calcula mediante una curva de calibración.

3 REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. **Zero Standard** (1 vial) 3 mL and **Standard (Standard 1 - 5)**, 5x (1 vial = 1 mL)
2. Ferritin **Control** (Control) (1 frasco) 1 mL
La concentración de control se indica en el Certificado de análisis (Certificate of Analysis).
3. **Enzyme Conjugate** (Conjugado) (1 vial) 21 mL
Anticuerpo anti Ferritina conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)
4. **Microtiterwells** (Microplaca recubierta) (1 microplaca que se puede romper)
Anticuerpo anti Ferritina absorbido en microplaca
5. **Substrate Solution** (Substrato de TMB) (1 vial) 15 mL
 H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (*evitar el contacto con la piel*)
6. **Stop Solution** (Solución de parada) (1 vial) 15 mL
Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (*evitar el contacto con la piel*)
7. **Wash Solution** 10X (Solución de lavado conc. 10X) (1 vial) 50 mL
Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4

3.2 Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada

3.3 Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

4 ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.
- El sustrato de TMB contiene un irritante que es perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.
- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

5 PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 °C y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente probado.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo y/o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles y/o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.

6 ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2 °C - 8 °C en un lugar oscuro.

El kit es estable a 2 °C - 8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.

Una vez abierto, el kit es estable a 2 °C - 8 °C durante 5 meses.

La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2 °C - 8 °C.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

7 RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de suero (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel de separación de suero) o plasma (heparina de litio, heparina de sodio o EDTA de potasio).

Almacenamiento de muestras	Duración
2 °C - 8 °C	72 horas
Ciclos de congelación/descongelación	3 ciclos

8 PROCEDIMIENTO

8.1 Preparación de calibradores y controles

Los calibradores están listos para su uso y se proporcionan con las siguientes concentraciones:

	S0	S1	S2	S3	S4	S5
ng/mL	0	5	20	100	400	800

El control está listo para su uso.

8.2 Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial « Wash Solution» con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:10.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado también de transferir los cristales enjuagando completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

8.3 Preparación de las muestras

La determinación de la ferritina debe realizarse con suero o plasma humano.

8.4 Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2 °C - 8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2 °C - 8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana y/o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (S0 - S5), dos para el control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Muestra/ Control		10 µL	
Calibrador S0 - S5	10 µL		
Conjugado	200 µL	200 µL	
<p>Incube durante 1 hora a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C). Retire el contenido de cada pozo. Lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.</p> <p>Nota importante: en cada paso de lavado manual, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente.</p> <p>Lavadora automática: si utiliza un equipo automático, lave los pocillos al menos 5 veces.</p>			
Sustrato de TMB	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) en la oscuridad.</p>			
Solución de detención	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Agite suavemente la microplaca.</p> <p>Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.</p>			

9 CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

El kit de control incluido en el kit deberá ser probado como desconocido y está destinado a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

DRG recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de la calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control¹².

10 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. Se recomienda un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL) o de splines cúbicos, **incluido el calibrador 0 (Standard 0)**.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El calibrador 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

11 RANGO DE MEDICIÓN

El rango de medición del ensayo (AMR) es de 2,84-800 ng/mL.

Cualquier valor que sea inferior a 2,84 ng/mL debe informarse como «< 2,84 ng/mL». Cualquier valor que sea superior a 800 ng/mL debe informarse como «> 800 ng/mL».

12 METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD

El ensayo Ferritin ELISA ha sido estandarizado con respecto a los estándares de referencia internos (matriz de suero), cuyo valor ha sido asignado a otro método de prueba disponible en el mercado.

13 VALORES ESPERADOS

Los rangos siguientes se determinaron usando el ensayo Ferritin ELISA y se facilitan solo con fines informativos. El intervalo de referencia del 95 % para adultos aparentemente sanos se calcularon mediante un método no paramétrico siguiendo la orientación de CLSI C28-A3 "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

	n	Mediana (ng/mL)	Intervalo de referencia (ng/mL)
Mujeres			
Premenopáusicas	42	33,5	8,4– 156,9
Posmenopáusicas	42	44,8	16,8 – 180,8
Hombres	84	122,5	21,7 – 276,4

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

14 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

14.1 Capacidad de detección

El límite de blanco (LoB), el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se determinaron con orientación del documento CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation", usando 6 blancos y 6 muestras de bajo nivel.

Sensibilidad	Concentración
Límite de blanco (LoB)	0,35 ng/mL
Límite de detección (LoD)	2,00 ng/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	2,84 ng/mL

14.2 Veracidad

Se ha demostrado la veracidad mediante la comparación del método Ferritin ELISA con un ensayo disponible en el mercado que utiliza muestras de donantes nativos; consulte la sección 15.5

14.3 Precisión

La precisión de Ferritin ELISA se determinó mediante la realización de un estudio de precisión complejo.

Repetibilidad: Se analizaron un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores. A continuación se muestran los datos de un lote representativo:

Muestra	n	Medio conc. (ng/mL)	Intraprueba (repetibilidad)	
			DE	CV
1	75	9,21	1,23	13,3 %
2	75	68,30	2,47	3,6 %
3	75	178,38	9,44	5,3 %
4	75	380,97	26,54	7,0 %
5	75	467,72	25,58	5,5 %
6	75	619,17	51,33	8,3 %

Reproducibilidad: Se analizaron un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores. A continuación se muestran los resultados de los datos combinados de dos lotes:

Muestra	n	Medio conc. (ng/mL)	Dentro del laboratorio (reproducibilidad)	
			DE	CV
1	150	8,96	1,21	13,5 %
2	150	67,85	4,31	6,4 %
3	150	177,92	14,14	7,9 %
4	150	377,41	32,10	8,5 %
5	150	460,17	46,83	10,2 %
6	150	614,18	75,43	12,3 %

14.4 Linealidad

La linealidad se evaluó en base a CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". Para la concentración de ferritina mediante Ferritin ELISA, el procedimiento de medición muestra linealidad para el intervalo de 2,5 a 849 ng/mL dentro de la desviación de linealidad permitida (ADL) de ± 15 %.

14.5 Comparación de métodos

El ensayo Ferritin ELISA se comparó con un ensayo automatizado cuantitativo de ferritina disponible comercialmente, siguiendo CLSI EP-9A, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Se analizaron un total de 100 muestras, seleccionadas para representar un amplio rango de concentraciones de ferritina [15,65 a 782 ng/mL] usando cada uno de los métodos. Se realizó el análisis de regresión de Passing y Bablok en los datos comparativos:

n	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (ng/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
100	0,96 [0,92 a 1,01]	0,24 [-5,46 a 3,07]	0,96

14.6 Especificidad analítica

Las siguientes sustancias no interfieren con un sesgo de $> \pm 15$ % en la Ferritin ELISA cuando las concentraciones están por debajo del umbral indicado presentado en la siguiente tabla.

Reactivos que pueden interferir	Límite máximo de concentración
Bilirrubina, conjugada	15 mg/dL
Bilirrubina, no conjugada	15 mg/dL
Hemoglobina	1000 mg/dL
Proteína total	10 g/dL
Triglicéridos	3000 mg/dL

14.7 Estudio en suero-plasma

El estudio de comparación de la matriz de Ferritin ELISA se realizó para evaluar la diferencia entre los tipos de tubos (tubos separadores de suero [SST], plasma de heparina de litio, plasma de heparina sódica y plasma K2 EDTA) frente a las muestras de control (tapón rojo para suero, sin aditivos) siguiendo las directrices de CLSI EP9-A3. Se evaluó un total de 20 muestras para cubrir el intervalo del ensayo. Se realizó el análisis de regresión de Passing y Bablok en los datos comparativos:

Tipo de muestra	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (ng/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
SST	1,02 [0,99 a 1,25]	-1,02 [-4,98 a 0,28]	1,00
Heparina de litio	1,04 [0,95 a 1,09]	-1,61 [-3,33 a 0,42]	1,00
Heparina sódica	1,07 [0,98 a 1,21]	-1,92 [-4,51 a -0,22]	1,00
EDTA	0,97 [0,88 a 1,06]	-1,02 [-3,24 a 0,66]	1,00

14.8 Efecto gancho

No se observó ningún efecto gancho con el ensayo Ferritin ELISA hasta 10 000 ng/mL.

15 LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar ante las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos in vitro¹³. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

16 GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.





17 RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar; si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante y/o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional.

18 BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / LITERATUR

1. Muñoz M, García-Erce JA, Remacha ÁF. Disorders of iron metabolism. Part II: iron deficiency and iron overload. *J Clin Pathol*. 2011 Apr;64(4):287-96.
2. Moyer TP, Highsmith WE, Smyrk TC, Gross JB Jr. Hereditary hemochromatosis: laboratory evaluation. *Clin Chim Acta*. 2011 Aug 17;412(17-18):1485-92.
3. Crownover BK, Covey CJ. Hereditary hemochromatosis. *Am Fam Physician*. 2013 Feb 1;87(3):183-90.
4. Daru J, Colman K, Stanworth SJ, De La Salle B, Wood EM, Pasricha SR. Serum ferritin as an indicator of iron status: what do we need to know? *Am J Clin Nutr*. 2017 Dec;106(Suppl 6):1634S-1639S.
5. Peyrin-Biroulet L, Williet N, Cacoub P. Guidelines on the diagnosis and treatment of iron deficiency across indications: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 2015 Dec;102(6):1585-94.
6. De Franceschi L, Iolascon A, Taher A, Cappellini MD. Clinical management of iron deficiency anemia in adults: Systemic review on advances in diagnosis and treatment. *Eur J Intern Med*. 2017 Jul;42:16-23.
7. Cappellini MD, Musallam KM, Taher AT. Iron deficiency anaemia revisited. *J Intern Med*. 2020 Feb;287(2):153-170.
8. Friedman AJ, Shander A, Martin SR, Calabrese RK, Ashton ME, Lew I, Seid MH, Goodnough LT. Iron deficiency anemia in women: a practical guide to detection, diagnosis, and treatment. *Obstet Gynecol Surv*. 2015 May;70(5):342-53.
9. Lopez A, Cacoub P, Macdougall IC, Peyrin-Biroulet L. Iron deficiency anaemia. *Lancet*. 2016 Feb 27;387(10021):907-16.
10. Daru J, Allotey J, Peña-Rosas JP, Khan KS. Serum ferritin thresholds for the diagnosis of iron deficiency in pregnancy: a systematic review. *Transfus Med*. 2017 Jun;27(3):167-174.
11. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
12. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Fertigungslosnummer, Charge *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Biological risks*	Biologische Risiken*	Rischi biologici	Riesgos biológicos	Risques biologiques
	Caution *	Achtung *	Attenzione	Precaución	Attention
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité