

# Ferritin kit

ELISA Testkit für die quantitative Bestimmung  
von Ferritin in humanem Blutserum

*(Gebrauchsanweisung: Seite 4)*

Enzyme immunoassay for quantitative  
determination of ferritin in human serum

*(Instructions for use: page 29)*

Manueller Test / Manual test

*Abschnitt / Section 13*

Automatisierter Test / Automated test

*Abschnitt / Section 14*

**IVD**

Ferritin Kit (Manueller Test)  
Ferritin kit (manual test)



96 Untersuchungen  
96 tests

**40-01**

**REF**

Ferritin Kit (Automatisierter  
Test für "Alisei")  
Ferritin kit (automated test  
for "Alisei")









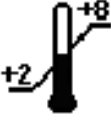


















96 Untersuchungen  
96 tests

**40-01 A**

**REF**

# 1. KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biogefährdung Biological risks
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Konjugat Conjugate
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Substrat Substrate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Stopplösung Stop solution
			
	Kalibratoren Calibrators		Kontrolle Control
	Trial-Lösung, 5000x konzentriert Trial, 5000X concentrated		Optische Dichte Optical density
			
	Ausreichend für <n> Prüfungen Contains sufficient for <n> tests		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
	Reizend Irritant		

**Warning**



## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der **Ferritin Testkit** wird für die **quantitative Bestimmung** von **Ferritin im menschlichen Blutserum** verwendet.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

- REF 40-01** Für den manuellen Gebrauch;  
**REF 40-01 A** Für den Gebrauch mit ELISA-Automat "Alisei", hergestellt durch die Firma Next Level S.r.l.

Die Gebrauchsanweisungen befinden sich:

- Abschnitt 13 Manueller Test;  
 Abschnitt 14 Automatisierter Test "Alisei".

**Anmerkung 1:** *Die Konzentrationswerte der Kalibratoren können bei manuellem und automatisiertem Testkit variieren.*

**Anmerkung 2:** *Wir garantieren verlässliche Testergebnisse bei folgender Anwendung der Testkits:*

- REF 40-01 A** nur für ELISA-Automat "Alisei".  
**REF 40-01** nur für den manuellen Gebrauch.

Ferritin ist ein intrazelluläres Protein. Es stellt einen löslichen Eisen-Pool her, welcher für eine erfolgreiche Erythropoese notwendig ist. Gleichzeitig schützt es den Körper vor einer toxischen Wirkung des Eisens, die auf der Katalyse freier Radikale beruht.

Das Ferritin-Molekül besteht aus einem eisenhaltigen Kern und einer Eiweißmembran (Apo ferritin) mit einer Molekularmasse von ca. 450 kDa. Die Eiweißmembran wird aus 24 «leichten» (L) und «schweren» (H) Untereinheiten gebildet. Jedes Ferritin-Molekül kann bis 4500 Eisenatome in Hydroxid- und Phosphatkomplexen binden.

Ferritin kommt hauptsächlich in Milz-, Leber- und Blutkörperchen des roten Knochenmarks vor. In geringen Mengen ist Ferritin auch im Blutplasma enthalten.

Die Ferritin-Konzentration im menschlichen Plasma erlaubt, die gesamte Eisen-Reserve des Organismus abzuschätzen.

Bei der Geburt ist die Ferritin-Konzentration hoch (bis 600 ng/ml). Innerhalb der ersten Monate wird sie ungefähr auf eine Konzentration von 30 ng/ml reduziert. Danach steigt sie wieder langsam an und erreicht bis zum 24.-25. Lebensjahr ein Wert, der bis zum Alter konstant bleibt. Der Normwert der Ferritin-Konzentration im Blutserum von Männern liegt bei 50-250 ng/ml und im Blutserum von Frauen bei 20-150 ng/ml.

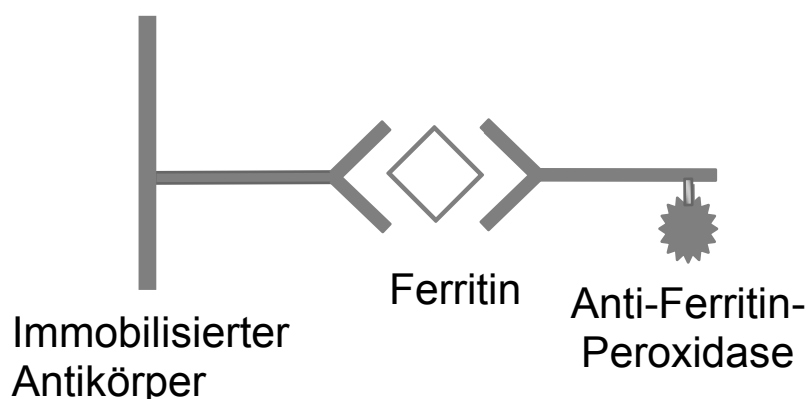
Eine Ferritin-Konzentration unter 10 ng/ml weist auf eine Eisenmangelanämie hin. Dabei hat die Ferritin-Konzentration eine große Bedeutung für die Unterscheidung der Eisenmangelanämie von den anderen Anämiearten. Außerdem ist die Ferritin-Konzentration als Marker für das Monitoring der Eisenvorräte im Körper schwangerer Frauen, Blutspender und Patienten, bei denen häufig eine Hämodialyse durchgeführt wird, geeignet. Im Fall eines Eisenüberschusses im Körper überschreitet die Ferritin-Konzentration einen Wert von 400–500 ng/ml und erreicht bei einer ausgeprägten Hämochromatose einige Tausende ng/ml.

Die Ferritin-Konzentration im Blutserum steigt ebenfalls bei Infektions- und Entzündungsvorgängen (Knochenmarks-Entzündung, rheumatoide Arthritis), akuten und chronischen Lebererkrankungen, Leukämie, Morbus Hodgkin, Mammakarzinomen und einigen anderen Tumorerkrankungen an.

### 3. TESTPRINZIP

Der **Ferritin Testkit** ist ein "Sandwich"-Typ des Festphasen-Enzymimmunoassays, basierend auf zwei monoklonalen Antikörpern, die spezifisch an unterschiedliche Epitope des Ferritin-Moleküls binden. Einer dieser Antikörper ist mit der Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert, der zweite ist an die Innenfläche der Kavität gebunden. Die Ferritin-Moleküle der Blutserumprobe binden sowohl den immobilisierten Antikörper als auch das Anti-Ferritin-Peroxidase-Konjugat (Abb. 1). Beim Waschen der Kavitäten mit der Waschlösung werden alle ungebundenen Komponenten entfernt. Die Menge des gebundenen Konjugates ist direkt proportional zur Ferritin-Konzentration der zu testenden Probe.

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich eine Farbreaktion. Die Intensität der Färbung korreliert mit der Menge des Ferritins der Probe oder des Kalibrators. Die Ferritin-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.



*Abb. 1 Schema des Testkits*

## 4. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **Ferritin Testkit** ist nach dem Empfang und bis zur Verwendung bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig. Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 18 Monate.

Nach der Öffnung ist der Testkit bei einer Lagerung von +2...+8 °C bis zu 12 Monate haltbar.

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt nach dem Öffnen wie folgt zu lagern aber die Komponenten dürfen nie länger als bis zu ihrem Ablaufdatum verwendet werden:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Konjugat, Kalibratoren, Kontrolle (gebrauchsfertig): bei +2...+8 °C für 12 Monate;
- Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei einer Temperatur von +2...+8 °C für maximal 1 Monat;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**;
- Fläschchen der konzentrierten Trial-Lösung und Waschlösung und Stopplösung: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25

°C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8°C für maximal 4 Wochen;

- Gebrauchsfertige Trial-Lösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage.

### **Beschädigte Testkits**

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

## **5. PROBENGEWINNUNG UND -LAGERUNG**

Blut durch Venenpunktion entnehmen. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt.

Es ist nicht zulässig, für eine Analyse Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämisches (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Proben sind bei der Temperatur von +2...+8 °C nicht länger als 2 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauernden Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von  $\leq -20$  °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

## **6. REFERENZWERTE**

Mit Hilfe des **Ferritin Testkits** wurden Blutserumproben von 184 gesunden Männern (21-45 Jahre), 140 gesunden Frauen (19-43 Jahre) sowie 52 schwangeren Frauen (20-34 Jahre) untersucht. Die ermittelten Konzentrationswerte sind in



folgender Tabelle dargestellt. Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die Ferritin–Normkonzentrationen bestimmt.

<b>Gruppe</b>	<b>Ferritin-Konzentrationsbereich (ng/ml)</b>	<b>Ferritin- Mittelwert Konzentration (ng/ml)</b>
Männer	22-346	158
Frauen	10-147	73
Schwangere Frauen (I. Drittel)	55-90	61
Schwangere Frauen (II. Drittel)	25-74	32
Schwangere Frauen (III. Drittel)	10-16	12

## **7. QUALITÄTSKONTROLLE**

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend der nationalen und regionalen Vorschriften zu benutzen. Der Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

## **8. REAGENZIVORBEREITUNG**

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

## **MP Mikrotiterplatte**

Die Verpackung der **Mikrotiterplatte** vor der Öffnung mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) lagern und anschließend wie folgt vorbereiten:

- Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

## **CAL CONTROL Kalibratoren und Kontrolle**

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig.

Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten:

- Durch leichtes Klopfen auf den Deckel wird der Feststoff vom Flaschenrand gelöst.
- Die Fläschchen werden vorsichtig geöffnet und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche gelegt.
- 0,5 ml deionisiertes/ destilliertes Wasser wird jeweils in die Flaschen pipettiert, diese wieder mit jeweiligem Deckel verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) ohne Schütteln inkubiert.
- Danach unter Vermeidung von Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist. Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur unter periodischem Schütteln inkubieren. Es darf kein Feststoff im Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.

## **WASH P Waschlösung**

Zubereitung der benötigten Menge der Waschlösung durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem

Wasser:

5 ml **WASH P** **20X** + 95 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

**SUB** **Substrat** vor direktem Licht schützen.

## 9. PROBENVORBEREITUNG

Proben auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, um Homogenität zu erreichen.

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

### 10.1 Kalibrierung:

Der **Ferritin Testkit** wurde gemäß dem Zweiten Internationalen Standard WHO 80/578 kalibriert.

### 10.2 Spezifität:

Laut der Produktspezifikation des Lieferanten wurde keine Kreuzreaktion zwischen den beiden monoklonalen Ferritin-Antikörpern der Testkit-Charge und Serumalbumin, Hämoglobin, Transferrin, Alpha-Fetoprotein und Eisenchlorid nachgewiesen.

### 10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **Ferritin Testkits**, die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 5 ng/ml. Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der Optischen Dichte des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (+ 2 SD) gebildet.

## 10.4 Messbereich:

Die **Ferritin Testkits** (manuelles und Alisei Kits) sind validiert für die Detektion einer Ferritin-Konzentration innerhalb eines Bereiches von 5-1000 ng/ml.

## 10.5 High-Dose-Hook-Effekt:

Der High-Dose-Hook-Effekt wurde bis zu einer Ferritin-Konzentration von 10 000 ng/ml nicht nachgewiesen. Der High-Dose-Hook-Effekt wurde durch Aufstocken der Kalibrator 0-Matrix mit Antigen bestimmt.

## 10.6 Intra-Assay und Inter-Assay Varianz:

Um einen **Intra-Assay Variationskoeffizienten** (VK) festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

### Manuelles Testkit

Probe	Ferritin-Mittelkonzentrationswert, ng/ml	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	16,4	0,62	3,8
2	18,1	0,64	3,5
3	59,9	1,85	3,1
4	113	2,4	2,1
5	151	3,7	2,4
6	343	21,3	6,2
7	450	19,8	4,4
8	627	12,5	2,0

## Alisei Testkit

Probe	Ferritin-Mittelkonzentrationswert, ng/ml	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	11,1	0,78	7,0
2	21,4	1,13	5,3
3	75,7	2,45	3,2
4	137	4,9	3,6
5	225	5,3	2,4
6	450	9,8	2,2
7	664	26,2	3,9
8	897	38,9	4,3

Um einen **Inter-Assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben drei Mal mit einem Intervall von 1 Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 9 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

## Manuelles Testkit

Probe	Ferritin-Mittelkonzentrationswert, ng/ml			Inter-Assay Präzision	
	1. Untersuchung	2. Untersuchung	3. Untersuchung	SD	VK, %
1	15,2	13,7	14,1	0,79	5,5
2	44,0	44,8	43,2	0,90	2,0
3	51,3	49,1	54,2	2,52	5,0
4	81,0	80,5	80,1	0,50	0,6
5	120	124	120	2,1	1,8
6	277	275	283	4,2	1,5
7	366	375	382	8,0	2,2
8	583	588	609	13,8	2,4

## Alisei Testkit

Probe	Ferritin-Mittelkonzentrationswert, ng/ml			Inter-Assay Präzision	
	1. Untersuchung	2. Untersuchung	3. Untersuchung	SD	VK,%
1	11,1	12,3	10,6	0,87	7,7
2	21,4	20,1	22,7	1,30	6,1
3	75,7	88,2	85,3	6,54	7,9
4	137	145	149	6,11	4,2
5	225	258	244	16,6	6,8
6	450	498	462	25,0	5,3
7	664	623	651	20,9	3,2
8	897	923	915	13,3	1,5


### 11. GRENZEN DER METHODE

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen Befunde und Laborbefunde berücksichtigt werden.

### 12. VORSICHTSMAßNAHMEN



- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.
- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die vorn angegebene Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.

- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen Tetramethylbenzidin, Stopplösung und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- TMB, Stopplösung und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur "P"-gekennzeichnete Astra Biotech-Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 N Salzsäure (HCl-Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Haut- oder Schleimhautkontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
  - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren.
  - Kontamination der Lösungen vermeiden;
  - Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben, nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
  - Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;
  - Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden. Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
  - Die Temperatur der Inkubation aller immunologischer Reaktionen muss bei +37 °C liegen;

- Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
- Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, die Ferritin-Konzentration der Kontrolle jedes Mal zu bestimmen;
- Entfernen Sie die Klebeschutzfolie vorsichtig um eine Kontamination zu vermeiden und verwenden Sie dieselbe Klebeschutzfolie nicht erneut.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates.
-  Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV (Human Immunodeficiency Virus) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien und Patienten Proben sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
-  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel (Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen), die mit den Proben während der Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle vom Autoklavieren durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden. Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher



Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt.

-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
  - Im Laborraum nicht rauchen, trinken oder essen;
  - Schutzhandschuhe verwenden;
  - Nie mit dem Mund pipettieren;
  - Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren.
- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
- P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
- P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;

- P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;
- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.

## 13. MANUELLER TEST (REF 40-01)

### 13.1 Packungsinhalt

<b>MP</b>	<b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Ferritin-Antikörpern	1 Platte
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat:</b> Lösung aus monoklonalen Ferritin-Antikörpern konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	14 ml gebrauchsfertig
<b>0-5 CAL</b>	<b>Ferritin Kalibratoren:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter Ferritin-Konzentration: 0;10;30;100;300;1000 ng/ml (ungefähre Werte - verwenden Sie die Daten nicht für die Auswertung des Assays). Die Konzentrationen der Kalibratoren können sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Die exakten Lot spezifischen Ferritin-Konzentrationen sind im Quality Control Sheet angegeben.	6 Fläschchen, je 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>CONTROL</b>	<b>Ferritin Kontrolle:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter Ferritin-Konzentration. Der Konzentrationsbereich kann sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Der Lot spezifische Ferritin-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>SUB</b>	<b>Substrat (TMB-Lösung):</b> 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml gebrauchsfertig

<b>WASH P</b> <b>20X</b>	<b>Waschlösung P, 20x, konzentriert:</b> Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	2x14 ml konzentriert
<b>STOP</b>	<b>Stopplösung:</b> 1 N HCl-Lösung	14 ml gebrauchsfertig
	<b>Klebeschutzfolie</b>	2x1 Folie (optional)

### 13.2 ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN UND EQUIPMENT

- geeichte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- geeichte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator (+37 °C) oder Mikrotiterplatten/Inkubator-Schüttler (+37 °C, 500-800 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Vortexer;
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser;
- Messzylinder, Becherglas;
- separate Behälter zum Pipettieren mit 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Labor-Handschuhe;
- Absorbierendes Material (z.B. Papierhandtücher).

## 13.3 Testablauf

Der **Ferritin Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Doppelbestimmung von 40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Leerwertes (Blank = OD der TMB-Lösung).

### 13.3.1 Assay-Durchführung

**Anmerkung:** Bitte überprüfen Sie auf dem mit dem Kit gelieferten Quality Control Sheet, für welches Assay-Protokoll Ihr Kit validiert wurde. Wenn Ihr Kit für das Assay Protocol 1 validiert wurde, folgen Sie bitte dem unten beschriebenen Assay Protocol 1. Wenn Ihr Kit zusätzlich für das Assay Protocol 2 validiert wurde, beachten Sie bitte die Ergänzung 1 zu der mit dem Kit gelieferten Gebrauchsanweisung.

#### Assay-Protokoll 1

(siehe auch Assay-Schema für Assay-Protokoll 1, Abschnitt 13.5)

**Anmerkung:** Dazugehörige Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollbereiche für das Assay-Protokoll 1 sind im Quality Control Sheet enthalten.

**Alle Proben sollten in Zweifachbestimmung gemessen werden.**

**A. 20 µl der Kalibratoren CAL, Kontrolle CONTROL und Serumproben** in Zweifachbestimmung in entsprechende

Kavitäten pipettieren. **Kavitäten A1-A2 bleiben frei (Blank)!**

**B. 100 µl Konjugat [CONJ]** in alle Kavitäten **außer** Kavitäten **A1-A2** pipettieren.

*Anmerkung: Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.*

*Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.*

**C. 30 Minuten** bei **+37 °C** unter Schütteln (**500-800 rpm**) inkubieren.

*Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.*

**D. 5x**, wie unten beschrieben, waschen.

**E. 100 µl Substrat [SUB]** in jede Kavität pipettieren (auch Blank); Streifen **entweder** bei **Raumtemperatur im Dunkeln** für **15–30 Minuten** (abhängig von der Farbintensität) oder für **10 Minuten bei +37 °C** unter Schütteln (**500-800 rpm**) inkubieren.

**F. 100 µl Stopplösung [STOP]** in alle Kavitäten (auch Blank) in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat pipettieren und für **1-2 Minuten** bei **Raumtemperatur schütteln**.

**G. Messen der Optischen Dichte** bei **450 nm** innerhalb von **20 Minuten**.

### 13.3.2 Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 5 Waschzyklen und einem jeweiligen Waschvolumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen.

Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einen Behälter mit Desinfektionsmittel verwerfen;
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5 bis 10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand verwerfen. 5 Mal wiederholen;
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

## 13.4 DATENVERARBEITUNG

Bei Benutzung eines Photometers, welcher keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 (Blank) von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert. *Beispiel:*

OD (Kalibrator 5) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;

OD (Kalibrator 5) berechnet =  $2,28 - 0,06 = \underline{2,22}$

### 13.4.1 Datenverlässlichkeit (für OD gemessen bei 450 nm)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert der OD des Blank (der Kavitäten A1-A2)  $\leq 0,100$ ;
- Mittelwert der OD des Kalibrator 5  $\geq 1,5$  (nach Blank Subtraktion);

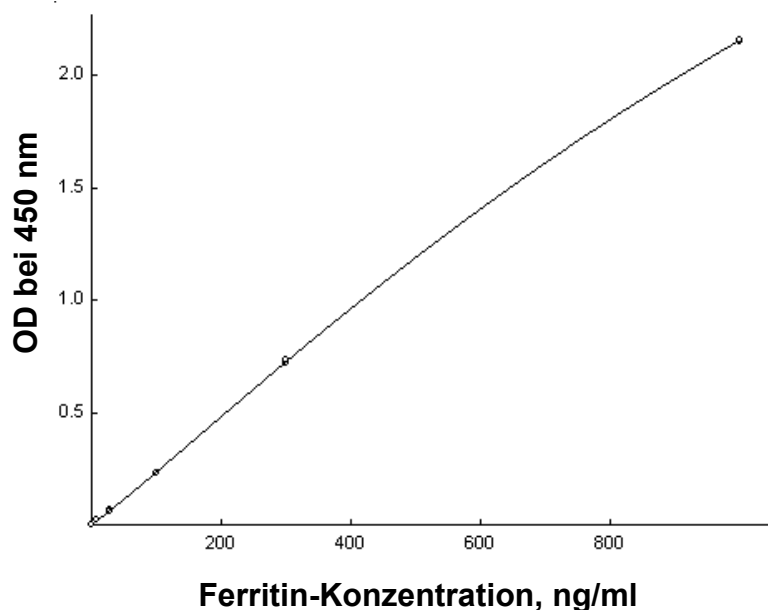
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Quality Control Sheet angegebenen ist.

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

### 13.4.2 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren werden gegen deren jeweilige Ferritin-Konzentration mittels **4PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die Ferritin-Konzentration der Probe wird mit der Standardkurve ermittelt.

Eine Extrapolation der Standardkurve für Ferritin-Konzentrationswerte, die die Konzentration in Kalibrator 5 überschreiten (etwa 1000 ng/ml), ist nicht zulässig.



*Abb. 2 Beispiel einer typischen Standardkurve*  
**Nicht zur Auswertung benutzen!**



### 13.5 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 1

Kavität	Reagenzien		
	«Blank»	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	Proben
<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	–	20 µl	–
Proben	–	–	20 µl
<b>CONJ</b>	–	100 µl	100 µl
Inkubation No.1	30 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>WASH P</b> (verdünnt)	5 x 300 µl		
<b>SUB</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No.2	15–30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>STOP</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

## 14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 40-01 A)

### 14.1 Packungsinhalt

<b>MP</b>	<b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti-Ferritin-Antikörpern.	1 Platte
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat:</b> Lösung aus Anti-Ferritin-Antikörpern konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	14 ml, gebrauchsfertig
<b>0-5 CAL</b>	<b>Ferritin Kalibratoren:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter Ferritin-Konzentration- 0; 10; 30; 100; 300; 1000 ng/ml (ungefähre Werte- bitte nicht für die Auswertung von realen Testdaten verwenden). Für Lot spezifische Ferritin- Konzentrationen siehe Werte im Quality Control Sheet.	8 Fläschchen, je 0,5 ml <b>CAL</b> 1, 4 2 × 0,5 ml; <b>CAL</b> 0, 2, 4, 5 – 1 × 0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>CONTROL</b>	<b>Ferritin Kontrolle:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter Ferritin-Konzentration. Der Ferritin-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	2x 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>WASH P 20X</b>	<b>Waschlösung P, 20x konzentriert:</b> Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert
<b>SUB</b>	<b>Substrat (TMB-Lösung):</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
<b>STOP</b>	<b>Stopplösung:</b> 1 N HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
<b>TRIAL 5000X</b>	<b>Trial-Lösung, 5000x konzentriert:</b> Reinigungslösung	Ist separat zu bestellen

**Anmerkung:** Extra Fläschchen der **CAL** 1 und 4 sowie **CONTROL** werden zur Rekalibrierung der Referenz-Standardkurve bereitgestellt. Genauere Informationen sind in der Gebrauchsanleitung des ELISA-Automaten "Alisei" zu finden.

## 14.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- ELISA-Automat "Alisei";
- Polypropylen Röhren 12x75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL 5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert\*;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser,
- Laborhandschuhe.

## 14.3 Testverfahren

Der **Ferritin Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Einzelbestimmung von 88 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Blank (=OD der TMB-Lösung).

### 14.3.1 Reagenzienvorbereitung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

**Anmerkung:** *Vorbereitung der anderen Reagenzien siehe Abschnitt 8.*

**TRIAL** Trial-Lösung zum Reinigen der gerät-internen Hydraulikleitungen und Nadeln des ELISA-Automaten.

---

\*Reagenz ist nicht im Kit enthalten und ist separat zu beziehen

Zubereitung der benötigten Menge der Trial-Lösung vor der Analyse durch 5000fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

2 ml **TRIAL 5000X** + 9998 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

### **14.3.2 Testablauf des automatisierten Tests**

Bei Benutzung des ELISA-Automaten „Alisei“ ist die entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes zu verwenden. Die Durchführung des Enzymassays mit „Alisei“ ist komplett automatisch: Pipettieren der Reagenzien, Waschschrte, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der Ferritin-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

## **14.4 Datenverarbeitung**

### **14.4.1 Datenverlässlichkeit (OD gemessen bei 450 nm)**

Siehe Kriterien des Abschnittes **13.4.1**.

## **14.5 Vorsichtsmaßnahmen**

- Bei mehrfacher Nutzung des Testkit in einem ELISA-Automaten müssen die Reagenzien aufgrund der Verdunstung unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um einen möglichen Verlust durch Verdunstung zu vermeiden. Die Reagenzien sind in den Kühlschrank zu stellen.
- Die Rekalibrierung anhand der Standardkurve eines Testkits mit anderer Lotnummer ist nicht zulässig.

## 2. INTENDED USE

The **Ferritin kit** is provided for the **quantitative** determination of **ferritin** in human serum.

This test has 2 complete sets:

**REF 40-01** for manual use;

**REF 40-01 A** must be used with ELISA automatic instrument “Alisei” manufactured by NEXT Level S.r.l. hereinafter referred to as analyser “Alisei”

Instructions for use are described in:

section 13 for manual test,

section 14 for automated kit for “Alisei”.

**Note 1:** *Take into account that calibrators’ nominals can be different for manual and automatic test kits.*

**Note 2:** *We guarantee applications of the test*

**REF 40-01 A** only on analyser “Alisei”,

**REF 20-01** only for manual use.

*While using a non-predefined method of use it is under end user responsibility to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.*

Ferritin is an intracellular protein. It makes soluble iron pool that is necessary for successful erythropoiesis. At the same time ferritin protects the organism from the toxic effect of iron (connected with catalysis of free radicals production).

Ferritin molecule consists of iron-containing core and protein shell (apoferritin) with a molecular mass of about 450 kDa. Apoferritin consists of 24 subunits of “light” (L) and “heavy” (H) types. Each ferritin molecule can bind up to 4500 iron atoms in hydroxide and phosphate complexes.

Ferritin is located mainly in spleen, liver and red bone marrow blood corpuscles; in small quantities it is also present in plasma. Ferritin concentration in plasma usually permits to estimate total iron reserve in the organism adequately.

Ferritin concentration at the moment of birth is high (up to 600 ng/mL). In the first months of life it falls and remains at the level of about 30 ng/mL till pubescence. Then ferritin concentration slowly begins to grow, the level reached at the age of 24–25 remains for life. Normal concentration of ferritin in serum is 50–250 ng/mL for men and 20–150 ng/mL for women.

Ferritin concentration below 10 ng/mL is a sign of asiderotic anemia. This parameter permits successfully differentiate asiderotic anemia from another types of anemia. Measurement of serum ferritin is also useful for monitoring of iron reserve in pregnant women, donors and patients subjected to regular haemodialysis. In the case of iron overloading ferritin concentration exceeds 400–500 ng/mL. It may reach several thousands ng/mL in the case of distinct hemochromatosis.

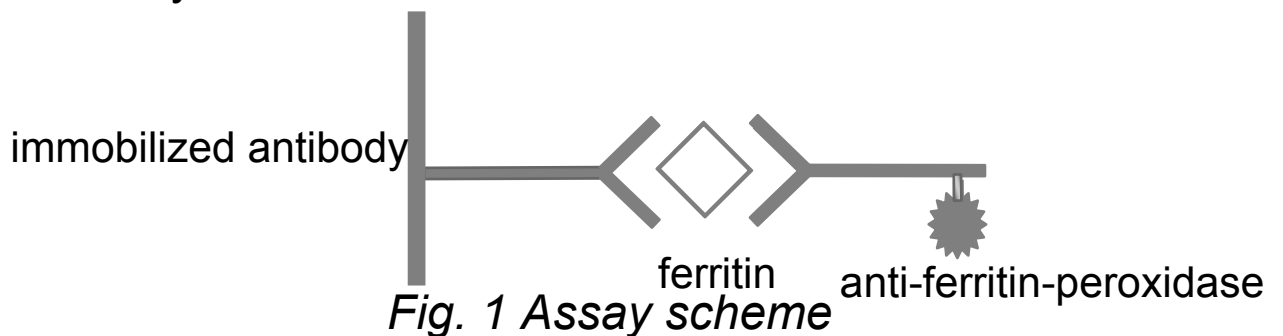
Concentration of serum ferritin increases in the case of infection, inflammatory processes (such as osteomyelitis and rheumatoid arthritis), acute and chronic liver disorders, leukemia, Hodgkin disease, breast cancer and some other oncopathologies.

### 3. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Ferritin kit** is a “sandwich” type of solid-phase enzyme immunoassay, based on two monoclonal antibodies that are specific for different epitopes of ferritin molecule. One of these antibodies is conjugated with horseradish peroxidase (HRP); the other coated onto on the inner surface of microwells.

Ferritin molecules from the serum sample are bound to both immobilized antibody and anti-ferritin-peroxidase conjugate. Then the wells are washed with wash solution to remove any material not bound to the inner surface of the wells. Quantity of the bound conjugate is directly proportional to ferritin level in the sample (Fig.1).

During the incubation with TMB solution the colour is developing. The intensity of the colour is directly proportional to ferritin concentration in specimens. Ferritin concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.



#### 4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

The expiration date of the kit is printed on the box label; the expiration date for each component is printed on the respective label.

The **Ferritin kit** should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 18 months.

After initial opening, the kit is stable for 12 months if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows but never used longer than the expiration date:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with conjugate, calibrators and control (ready-to-use): at +2...+8 °C for 12 months; vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 1 month after opening;
- vial with substrate: at +2...+8 °C until the expiration date, protected from light;
- vials with concentrated Trial, concentrated wash solution and stop solution: at +2...+8 °C until the expiration date;
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days or at +2...+8°C for no more than 4 weeks in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days in a firmly closed bottle.

### **Damaged Test Kits**

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.



## 5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipaemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative.

Store serum samples at +2...+8 °C for no more than 2 days. Aliquot and freeze the samples for longer storage ( $\leq -20$  °C). Avoid repeated freezing.

## 6. EXPECTED VALUES

Serum samples taken from 184 healthy men (age 21–45); 140 healthy women (age 19–43) and 52 pregnant women (age 20–34) were assayed with **ferritin assay**. The results are shown in the table below. These limits should be considered as guidelines only.

<b>Study Group</b>	<b>Ferritin concentration range (ng/mL)</b>	<b>Mean ferritin concentration (ng/mL)</b>
Healthy men	22-346	158
Healthy women	10-147	73
Pregnant women (I .trimester)	55-90	61
Pregnant women (II. trimester)	25-74	32
Pregnant women (III. trimester)	10-16	12

It is highly recommended for each laboratory to determine its own reference range of ferritin concentrations.

## 7. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to the state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

## 8. REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to reach room temperature, and then thoroughly stir.

### **MP** Microplate

Keep the **microplate** at room temperature (+18...+25 °C) for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

### **CAL** **CONTROL** Calibrators and Control

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter. Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature (+18...+25 °C) without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved. Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically. Make sure that no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

**WASH P Wash solution**

Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example:

5 mL **WASH P 20X** + 95 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

**SUB SUB Substrate**

Protect **substrate** from direct light.

## 9. SAMPLE PREPARATION

Allow samples to reach room temperature. Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

## 10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

### 10.1 Calibration – Traceability:

The **Ferritin kit** was calibrated against the WHO 2<sup>nd</sup> International Standard 80/578.

### 10.2 Specificity:

According to Product specification provided by the supplier, no cross-interaction of both anti-ferritin monoclonal antibodies with serum albumin, haemoglobin, transferrin, alpha-fetoprotein and iron chloride was detected.

### 10.3 Analytical sensitivity:

Analytical sensitivity of **Ferritin kit** i.e. concentration that can be distinguished from zero calibrator, is 5 ng/mL. It is defined as mean OD of 10 replicates of Calibrator 0 plus two standard deviations.

### 10.4 Measurement Range:

The **Ferritin kits** (manual and Alisei kits) were validated for measurement of ferritin concentration within the concentration diapason of 5-1000 ng/mL.

### 10.5 Hook Effect:

For **Ferritin kit** high dose hook effect was not detected for concentrations up to 10 000 ng/mL. High dose hook effect was determined by spiking calibrator 0 matrix with antigen.

### 10.6 Intra- and Inter-Assay Variation:

To determine **Intra-Assay CV** 8 serum samples were assayed in 9 replicates each. The results are shown below.

#### Manual kit

Sample	Mean ferritin concentration, ng/mL	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	16.4	0.62	3.8
2	18.1	0.64	3.5
3	59.9	1.85	3.1
4	113	2.4	2.1
5	151	3.7	2.4
6	343	21.3	6.2
7	450	19.8	4.4
8	627	12.5	2.0

#### Alisei kit

Sample	Mean Ferritin concentration, ng/mL	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	11.1	0.78	7.0
2	21.4	1.13	5.3
3	75.7	2.45	3.2
4	137	4.9	3.6
5	225	5.3	2.4
6	450	9.8	2.2
7	664	26.2	3.9
8	897	38.9	4.3

To determine Inter-Assay CV 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was assayed in 9 replicates. The results are shown below.

#### Manual kit

Sample	Mean ferritin concentration, ng/mL			Inter-Assay CV	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	15.2	13.7	14.1	0.79	5.5
2	44.0	44.8	43.2	0.90	2.0
3	51.3	49.1	54.2	2.52	5.0
4	81.0	80.5	80.1	0.50	0.6
5	120	124	120	2.1	1.8
6	277	275	283	4.2	1.5
7	366	375	382	8.0	2.2
8	583	588	609	13.8	2.4

#### Alisei kit

Sample	Mean ferritin concentration, ng/mL			Inter-Assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV,%
1	11.1	12.3	10.6	0.87	7.7
2	21.4	20.1	22.7	1.30	6.1
3	75.7	88.2	85.3	6.54	7.9


4	137	145	149	6.11	4.2
5	225	258	244	16.6	6.8
6	450	498	462	25.0	5.3
7	664	623	651	20.9	3.2
8	897	923	915	13.3	1.5

## 11. LIMITATION OF THE METHOD


Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. For diagnosis establishment, a physician is supposed to consider all available clinical and laboratory findings.

## 12. SAFETY PRECAUTIONS



- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.
- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.
- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.

- Note that stop solution is 1 N HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
  - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
  - avoid contamination of the solutions;
  - in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray; do not pour unused reagents back into the original vials;
  - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
  - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators, control and samples must not exceed 15 min;
  - the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at +37 °C;
  - do not touch the bottom of the wells;
  - calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time ferritin concentration in the control;
  - remove the adhesive foil carefully to avoid contamination and don't use the adhesive foil repeatedly.
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
-  Source materials of human origin used for kit components preparation were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, none of known laboratory test guarantees absence of these viral

agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.

-  After usage strips, calibrators, control, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment.

After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.

-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.
-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
  - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
  - always use protective gloves;
  - never pipette material by mouth;
  - in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



As the kit contains irritant (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:

- P261 - Avoid breathing spray;



- P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
- P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
- P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
- P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
- P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
- P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC No 1272/2008.

## 13. MANUAL TEST (REF 40-01)

### 13.1 Material Provided

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-ferritin monoclonal antibodies.	1 pcs.
<b>CONJ</b>	<b>Conjugate:</b> solution contains anti-ferritin monoclonal antibodies conjugated with HRP.	14 mL, ready to use
<b>0-5 CAL</b>	<b>Ferritin calibrators:</b> protein-based solution or lyophilized preparations containing known ferritin concentrations: 0;10;30;100;300;1000 ng/mL (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). The concentrations of calibrators may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific ferritin concentrations see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	6 vials, 0.5 mL each ready to use or lyophilized
<b>CONTROL</b>	<b>Ferritin control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known ferritin concentration. The range of ferritin concentration may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific ranges of ferritin concentration, see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	0.5 mL, ready to use or lyophilized
<b>SUB</b>	<b>Substrate (TMB solution):</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide.	14 mL, ready to use
<b>WASH P 20X</b>	<b>Wash solution P, 20X concentrated:</b> surfactant in buffered saline, sufficient for	2x14 mL, concentrated

	preparation of 560 mL of solution.	
<b>STOP</b>	<b>Stop solution:</b> 1 N HCl solution.	14 mL, ready to use
	<b>Adhesive foil</b>	2x1 foil (optional)

### 13.2 Equipment and Materials Required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator (+37 °C) or microplate incubator\_shaker (+37 °C, 500–800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

### 13.3 Test Procedure

The **Ferritin kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

#### 13.3.1 Assay Procedure

**Note:** *Please check in the Quality Control Sheet supplied with the kit for which Assay Protocol your kit has been validated. If your kit has been validated for Assay Protocol 1, please follow the Assay Protocol 1 described below. If your kit has been additionally validated for Assay Protocol 2, please consider the Supplement 1 to the Instructions for use provided with the kit.*

#### Assay Protocol 1

(see also Assay scheme to Assay Protocol 1, section 13.5)

**Note:** *Consider concentrations of calibrators and control range for Assay Protocol 1 provided in the Quality Control Sheet.*

**All samples should be tested in duplicates.**

- A.** Pipette **20  $\mu$ L** of calibrators **CAL**, control **CONTROL** and patient's samples in duplicates into the respective wells; **Leave wells A1-A2 empty for blank!**
- B.** Pipette **100  $\mu$ L conjugate CONJ** into each well, **except wells A1-A2.**

**Note:** *total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

**Note:** *If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.*

- C.** Incubate for **30 minutes at +37 °C while shaking (500–800 rpm)**.
- D.** Wash 5 times, as described below.
- E.** Pipette **100 µL substrate** **SUB** into each well (including blank); incubate strips at room temperature (+18...+25 °C) **in the dark for 15-30 minutes**, depending on the colour intensity, or **10 minutes while shaking (500-800 rpm) at +37 °C**.
- F.** Pipette **100 µL stop solution** **STOP** into each well (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. **Shake for 1–2 min at room temperature**.
- G.** Read OD at **450 nm within 20 min**.

### 13.3.2 Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 5 wash cycles and a volume of 300 µL of wash solution per well per cycle.

If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually as follows:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense 300 µL of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 5 times;
- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

## 13.4 . Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

*Example:*

OD (Cal 5) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 5) calculated =  $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

### 13.4.1. Data Reliability (for OD measured at 450 nm)

The data should meet the following criteria:

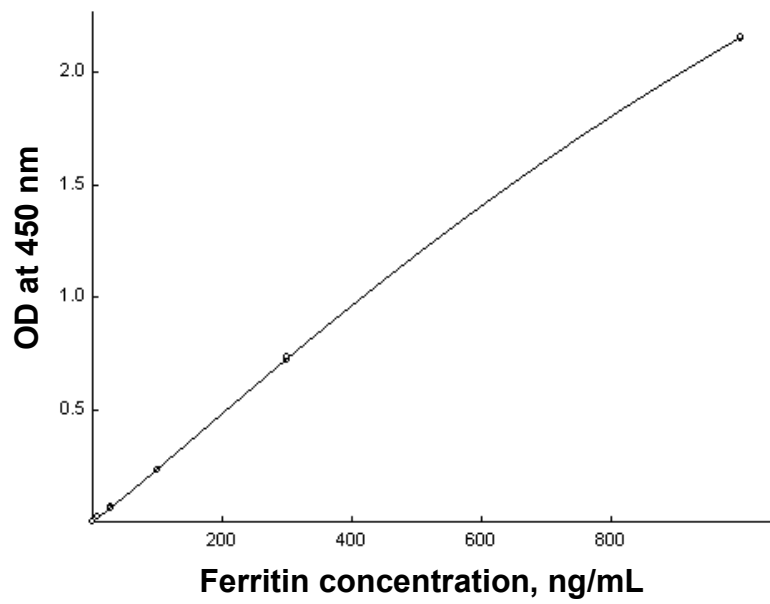
- average blank OD (in wells A1-A2)  $\leq 0.100$ ;
- average OD of Cal 5  $\geq 1.5$  (after blank subtraction).
  - control's concentration must fall within the acceptability range that is shown in the Quality Control Sheet.

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

### 13.4.2. Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD of calibrators are plotted versus their respective ferritin concentrations using **4PL fit** (Fig. 2 Typical standard curve). Calculate concentration of ferritin in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to ferritin above the nominal value of the calibrator 5 (approximately 1000 ng/mL) is forbidden.



*Fig. 2 Example of typical standard curve*  
**Do not use for evaluation of real assay data!**

### 13.5 Assay scheme to Assay Protocol 1

	Wells	«Blank»	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	Samples
Reagents				
<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>		–	20 µL	–
Samples		–	–	20 µL
<b>CONJ</b>		–	100 µL	100 µL
Incubation No.1	30 min, +37 °C, 500–800 rpm			
<b>WASH P</b> (diluted)	5 x 300 µL			
<b>SUB</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No.2	15–30 min, +18...+25 °C, in the dark			
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm			
<b>STOP</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C			
OD measuring	450 nm			
Calculations	Corresponding software			



## 14. AUTOMATIC TEST (REF 40-01 A)

### 14.1. Material Provided

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-ferritin monoclonal antibodies.	1 pcs
<b>CONJ</b>	<b>Conjugate:</b> solution contains anti-ferritin monoclonal antibodies conjugated with HRP.	14 mL, ready to use
<b>0-5 CAL</b>	<b>Ferritin calibrators:</b> protein-based solution or lyophilized preparations containing known ferritin concentrations – 0;10;30;100;300;1000 ng/mL (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific ferritin concentrations see values provided in the Quality Control Sheet	<b>8 vials,</b> 0.5 mL each: <b>CAL</b> 1, 4 – 2 × 0.5 mL; <b>CAL</b> 0, 2, 3, 5 – 1 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
<b>CONTROL</b>	<b>Ferritin control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known ferritin concentration. . For lot specific ranges of ferritin concentration see Quality Control Sheet	2 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
<b>WASH P 20X</b>	<b>Wash solution P, 20X concentrated:</b> surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
<b>SUB</b>	<b>Substrate (TMB solution):</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
<b>STOP</b>	<b>Stop solution:</b> 1 N HCl solution	19 mL, ready to use
<b>TRIAL 5000X</b>	<b>Trial solution, 5000X concentrated:</b> solution of detergent	It is delivered by separate order.

**Note:** Extra vials of **CAL** 1, 4 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for analyser "Alisei".

## 14.2. Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (analyser “Alisei”);
- multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.5 mL;
- **TRIAL 5000X** Trial solution, 5000X concentrated<sup>\*</sup>;
- deionized or distilled water;
- latex or plastic gloves.

## 14.3. Test Procedure

The **Ferritin kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

### 14.3.1. Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

**Note:** *Preparation of other reagents see in section 8.*

**TRIAL** Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyzer.

Prepare required volume of **Trial solution** by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

2 mL **TRIAL 5000X** + 9998 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

---

<sup>\*</sup> reagent is not included in the kit, it is delivered by separate order

### **14.3.2. Assay Procedure for Automatic Test**

While using for the procedure analyser “Alisei”, refer to its relative manual.

The analysis on analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation Ferritin concentration is hardwired in analyser memory.

## **14.4. Data Processing**

### **14.4.1. Data Reliability (OD measured at 450 nm)**

See criteria in section **13.4.1.**

## **14.5. Safety precautions**

- If kit for analyser “Alisei” is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from analyser “Alisei” immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator;
- Recalibration using calibration curve, obtained with a kit of any other lot, is not permitted.

August 27, 2019



Astra Biotech GmbH  
Rudower Chaussee 29,  
12489 Berlin, Germany  
Telefon: +49 (0)30 74696509  
E-Mail: [info@astrabiotech.de](mailto:info@astrabiotech.de)  
[www.astrabiotech.de](http://www.astrabiotech.de)