

Ferritin

CE

1. INTRODUCTION

La ferritine est une protéine globulaire principalement présente dans le foie et pouvant stocker environ 2250 ions de fer (Fe³⁺). La molécule de ferritine (apoferritine) est constituée de sous-unités lourdes et légères entourant un noyau cristallin qui contient de l'oxyde et du phosphate de fer. La ferritine est synthétisée dans le foie, dans la rate et dans de nombreux autres tissus : les concentrations majeures se trouvent dans le foie, la rate, la moelle osseuse et la muqueuse intestinale.

Les taux de ferritine ont une corrélation directe avec la quantité totale de fer stockée dans le corps. Si le taux de ferritine est élevé, le fer en excès est expulsé. Si le taux de ferritine est faible, il existe un risque de carence en fer qui pourrait déboucher sur une anémie.

En ce qui concerne la régulation de l'anémie, la mesure de la ferritine dans le sérum est la preuve de laboratoire la plus sensible pour évaluer l'anémie due à un manque de fer. Par contre, des taux normaux ou accrus de ferritine dans le sérum sont associés à une anémie chronique.

Des taux élevés de ferritine dans le sérum ont été observés dans les affections hépatiques aiguës et chroniques et dans les leucémies et lymphomes hodgkiniens. Des taux élevés de ferritine dans le sérum ont également été associés à un risque élevé d'infarctus du myocarde chez les hommes.

De plus, la ferritine sert d'indicateur pour les troubles résultant à la surcharge de fer, comme par exemple les hémochromatoses, dans lesquels le taux de ferritine peut être élevé.

La ferritine est un réactif de phase aiguë et ses taux sont souvent élevés au cours de la maladie.

Le fer libre est toxique pour les cellules et le corps a un ensemble élaboré de mécanismes de protection pour lier le fer dans divers compartiments des tissus. À l'intérieur des cellules, le fer est stocké sous forme de complexe à protéines comme la ferritine ou l'hémossidérine. L'apoferritine lie le fer ferreux libre et le stocke comme ferrique.

Dans des conditions normales, le taux de ferritine dans le sérum est en équilibre avec les dépôts de fer ; le taux de ferritine sérique est donc la preuve de laboratoire la plus efficace pour évaluer les dépôts de fer.

2. INDICATION D'UTILISATION

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition pour la détermination quantitative de la concentration de ferritine dans le sérum ou le plasma humain.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

Le test NovaTec ELISA pour la ferritine repose sur la capture simultanée de la ferritine humaine par deux anticorps monoclonaux, un immobilisé dans la microplaque, l'autre conjugué à de la peroxydase de raifort (HRP).

Après une période donnée d'incubation, la séparation libre-lié est obtenue par simple lavage de la phase solide.

Après, l'enzyme présent dans la réaction liée catalyse la réaction entre le substrat (H₂O₂) et le substrat TMB en développant une coloration bleue qui vire au jaune après ajout de la solution d'arrêt (H₂SO₄).

L'intensité de la couleur se développant est proportionnelle à la concentration de ferritine dans l'échantillon.

La concentration de ferritine dans l'échantillon est calculée sur la base d'une courbe d'étalonnage.

Un lecteur de microplaques ELISA permet la lecture de l'absorption à 450 nm.

4. MATÉRIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'IgG d'Anti-Ferritine** : 12 bandes détachables enduites d'IgG d'Anti-Ferritine de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop** : 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.15 mol/l (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué Anti-Ferritine-HRP** : 1 flacon contenant 12 ml d'Anti-Ferritine marqué à la peroxydase de raifort.
- **Solution de TMB** : 1 flacon contenant 15 ml de 3, 3', 5, 5'-Tétraméthylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26g/l) (éviter tout contact avec la peau).
- **Solution de lavage (concentrée x 10)** : 1 flacon contenant 50 ml du tampon phosphate 0.2M, pH 7,4.
- **Contrôle Ferritine** : 1 flacon contenant 1 ml d'un lot spécifique solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Étalons d'Estradiol**: 6 flacons, 3 ml d'étalon 0, 1 ml chacun étalon 1-5. Les étalons sont obtenus par étalonnage avec WHO 1st IS ferritine hépatique humaine 80/602 et présentent les concentrations suivantes:

Étalon 0:	0 ng/ml
Étalon 1:	5 ng/ml
Étalon 2:	20 ng/ml
Étalon 3:	100 ng/ml
Étalon 4:	400 ng/ml
Étalon 5:	1000 ng/ml

4.2. Matériels fournis

- 1 support de plaque
- 1 jeu de feuilles de recouvrement
- 1 mode d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériels et équipements requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm, 620-630 nm
- Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits
- Pipettes
- Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre 2°C et 8 °C à l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (22°C – 28 °C) pendant au moins 30 minutes avant de commencer le dosage ! À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à 2-8 °C ; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Bandes détachables enduites

Les bandes détachables sont enduites d'anticorps d'IgG anti Ferritine et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre 2°C et 8°C. N'ouvrir l'emballage que si la pièce est à température ambiante. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre 2°C et 8°C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

6.2. Conjugué Anti-Ferritine-HRP

Solution de conjugué Anti-Ferritine-HRP prête à l'emploi.

6.3. Etalons d'Estradiol

Les étalons sont prêts à l'emploi.

Après la première utilisation les étalons restent stables pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à 2 – 8° C.

6.4. Solution TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé 2°C et 8°C à l'obscurité. *La solution doit être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être remplacé.*

6.5. Solution stop

Le flacon contient une solution d'acide sulfurique 0.15 M (R 36/38, S 26) prête à l'emploi. .

6.6. Solution de lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 ml avant utilisation. Pour les petits volumes respecter la dilution au 10ème. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2°C et 8 °C. Il est possible d'observer la présence de cristaux dans la solution de lavage concentrée, dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à la dissolution complète des cristaux, pour une meilleure efficacité diluer tout le flacon de solution de lavage jusqu'à 500 ml en surveillant le transfert de cristaux avec le lavage de la bouteille, puis mélanger jusqu'à la dissolution complète des cristaux.

6.7. Contrôle

Le flacon contient 1 ml d'une solution de contrôle prête à l'emploi.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

La détermination de Ferritine peut être effectuée sur du plasma ou du sérum humain. Conserver les échantillons à -20°C si la détermination n'est pas effectuée le jour du prélèvement. Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. *Eviter les cycles répétés de congélation et de décongélation.*

7.1. Précaution d'usage

- Éviter l'exposition du réactif TMB/H₂O₂ à la lumière directe du soleil, aux métaux et aux substances oxydantes. Ne pas congeler la solution.
- Observer la plus grande précision dans la reconstitution et la distribution des réactifs.
- Cette méthode permet de déterminer des concentrations de Ferritine de 5 ng/ml à 1000 ng/ml.

8. PROCÉDE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans le kit, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et les placer sur le support. Réserver au moins :

1 puits (ex. A1)	Pour le blanc
2 puits (ex. B1+C1)	Pour l'étalon 0
2 puits (ex. D1+E1)	Pour l'étalon 1
2 puits (ex. F1+G1)	Pour l'étalon 2
2 puits (ex. H1+A2)	Pour l'étalon 3
2 puits (ex. B2+C2)	Pour l'étalon 4
2 puits (ex. D2+E2)	Pour l'étalon 5
2 puits (ex. F2+G2)	Pour le contrôle

Il est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

1. Pipeter 20 µl des étalons, de contrôle et d'échantillons dans leurs puits respectifs. Ajouter 100 µl de conjugué dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
2. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 1 heure à température ambiante (22 – 28°C).**
4. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage diluée. Éviter les débordements de puits de réaction.

Note importante : Pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

Équipement automatisé : Si vous utilisez l'équipement automatisé, lavez les puits au moins 5 fois.

Note : *L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.*

5. Pipeter 100 µl de solution de TMB dans tous les puits.
6. **Incuber pendant exactement 10 min à température ambiante (22 – 28°C) à l'obscurité.**
7. Pipeter 100 µl de solution stop dans tous les puits dans le même ordre à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque.
La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
8. Mesurer l'absorbance des échantillons à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le blanc au cours de 5 minutes.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc dans le puits A1.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à 450 nm et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets, si nécessaires.**

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

Calculer l'absorbance moyenne pour chaque point du courbe étalon et de chaque échantillon. Tracer la valeur d'absorbance moyenne des étalons en fonction de la concentration. Dessiner le meilleur ajustement de la courbe sur les points tracés (4 paramètres logistiques).

Interpoler les valeurs des échantillons sur le courbe étalon pour obtenir les valeurs de concentrations correspondantes en ng/ml.

9.2. Valeurs de Référence

Les valeurs de sérum ou de plasma de Ferritine sont comprises dans les intervalles suivants :

		Plage (ng/ml)	Moyenne (ng/ml)
Femmes	âge fertile	53	6 - 180
	post-ménopause	105	8 – 350
Hommes		20 – 400	175

10. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire doit faire des contrôles de dosage à des niveaux de gammes normales, élevées et faibles de Ferritine pour surveiller la performance des dosages. Ces contrôles doivent être considérés comme inconnus et les valeurs doivent être déterminés dans chaque test effectué. Les chartes de contrôles qualité doivent être maintenues pour suivre les performances des réactifs fournis. Des méthodes de statistiques pertinentes doivent être employées pour établir des tendances. Le laboratoire individuel doit établir des limites de performance de dosage acceptables. De plus, l'absorbance maximale doit être dans la même ligne que les expériences passées. Les déviations significatives provenant des performances établies peuvent indiquer un changement non remarquable dans les conditions expérimentales ou dans la dégradation des réactifs du kit. Les réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer la raison des variations.

11. PERFORMANCE DU DOSAGE

11.1. Précision

Variation Intra Dosage

La variation intra dosage a été déterminée par un réplicat (x 15) sur trois échantillons de sérum différents dans un dosage. La variation intra dosage est $\leq 7,5\%$.

Variation Inter Dosage

La variation inter dosage a été déterminée par un réplicat (x 16) sur trois échantillons de sérum différents en lots différents. La variation inter dosage est $\leq 6,1\%$.

11.2. Spécificité analytique

L'anticorps employé présente les réactions croisées suivantes, calculées sur la base du rapport de la masse:

Isoferritine hépatique humaine	100%
Isoferritine de rate humaine	80%
Isoferritine de cœur humain	12%

11.3. Sensibilité Analytique

La plus petite concentration détectable de Ferritine par l'étalon 0 est 0,04 ng/ml avec un niveau de confiance 95%.

11.4. Exactitude

L'épreuve de récupération conduite sur un échantillon enrichie avec 12,5 – 25 – 50 – 100 – 200 ng/ml de ferritine a donné une valeur moyenne (\pm SD) de 98,66% \pm 2,90%.

Le test de dilution effectuée sur 3 échantillons dilués jusqu'à 8 fois a donné une valeur moyenne (\pm SD) de 102,11 % \pm 5,32 %.

11.5. Comparaison de méthode

La méthode ELISA de Ferritine a été comparée à un autre dosage disponible dans le commerce des échantillons de sérum de 22 femmes et 32 hommes ont été testés.

La régression linéaire a été calculée:

$$(\text{Ferritine NovaTec}) = 1,11 * (\text{Ferritine Diasorin}) - 10,46$$
$$r^2 = 0,972$$

11.6. Effet « Hook »

Dans cette méthode, aucun effet Hook n'a été observé jusqu'à 50.000 ng/ml.

12. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation-décongélation répétés peuvent affecter les valeurs d'absorbances.

13. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir la pertinence, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro. Ne pas utiliser pour usage interne ou externe chez les Humains ou les Animaux.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Quand l'utilisation a automatisé l'équipement, l'utilisateur a la responsabilité de s'assurer que le kit a été convenablement évalué.
- Si le liquide n'est pas complètement extrait des puits, cela peut influencer la précision du dosage et/ou augmenter le bruit de fond. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités de Proclin 300^R comme conservateur. Eviter tout contact avec peau et les muqueuses.
- Le TMB est irritant, ce qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Eviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau et les yeux pour prévenir de ces risques.
- La solution stop est une solution d'acide sulfurique diluée. L'aide sulfurique est un poison corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Eviter tout contact avec la peau ou les yeux pour prévenir des brûlures chimiques.
- L'addition de la solution de substrat initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être fait durant la manipulation pour éliminer tous risques de dépassement de la durée de réaction.
- Les échantillons microbiologiquement contaminés ne doivent pas être utilisés pour le dosage. Les échantillons hautement lipémiques ou hémolysés ne doivent pas être utilisés non plus.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.
- La méthode ELISA de NovaTec est destinée à un personnel qualifié qui est familiarisé avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

AVERTISSEMENT :	Aux concentrations utilisées, la Proclin 300 [®] n'a que très peu de risque toxicologique s'il y a contact avec la peau ou les muqueuses !
AVERTISSEMENT :	L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !

13.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

14. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Prod. No.:

DNOV100

Ferritin (96 Dosages)