

Bioclin

BIOLISA FERRITINA

K109

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

Teste para determinação quantitativa de FERRITINA, em soro humano, por Enzimaimunoensaio em Microplaca.

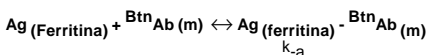
PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimétrico

Neste método, os calibradores de ferritina, amostras de pacientes ou controles são primeiro adicionados às cavidades revestidas por estreptavidina. Um anticorpo monoclonal biotinizado (específico para ferritina) é adicionado e os reagentes misturados. O resultado da reação entre o anticorpo biotinizado de ferritina e a ferritina nativa é um imunocomplexo que se deposita na cavidade revestida por estreptavidina. O excesso de proteínas séricas são lavadas através da etapa de lavagem. Outro anticorpo específico para a ferritina, marcado com uma enzima é adicionado às cavidades. O anticorpo marcado se liga à ferritina já imobilizada na cavidade. O excesso de enzima é lavado por uma etapa de lavagem. É gerada uma cor pela adição de um substrato. A intensidade da cor gerada é diretamente proporcional à concentração de ferritina na amostra.

A utilização de vários soros de referência com níveis conhecidos de ferritina permite a construção de uma curva da resposta de atividade / concentração. A partir da comparação da curva de resposta, a concentração de ferritina em uma amostra pode ser correlacionada.

Após misturar o anticorpo monoclonal biotinizado e um soro contendo o antígeno nativo, ocorre uma reação entre o antígeno nativo e o anticorpo, formando um complexo antígeno-anticorpo. A interação é ilustrada pela seguinte equação:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab (m)}$ = Anticorpo monoclonal biotinizado (em excesso)

Ag (Ferritina) = Antígeno nativo (quantidade variada)

$\text{Ag (Ferritina)} \cdot \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab (m)}$ = Complexo antígeno-anticorpo (quantidade variada)

k_a = Constante de associação

k_a = Constante de dissociação

REAGENTES

1) Padrões Referência (A – F)

Seis (6) frascos (A – F) de Padrões Referência de FERRITINA em diferentes concentrações, em solução de tampão pH 7,4 e azida sódica.:

A= 0,0 ng/mL

B= 10 ng/mL

C= 50 ng/mL

D= 150 ng/mL

E= 400 ng/mL

F= 800 ng/mL

2- Conjugado biotinizado (MoAb)

IgG monoclonal (camundongo) biotinizado em tampão, corante e conservante. Estocar entre 2-8°C.

3- Conjugado IgG

IgG anti-ferritina marcada com peroxidase em tampão, corante e conservante. Estocar entre 2-8°C.

4 - Placa sensibilizada

Estocar entre 2 e 8° C.



5 - Lavagem Concentrada (♦) (50x)

Solução de fosfato salina pH 7,4 e azida sódica. Estocar entre 2 e 30°C.

6 - Substrato A (S^A)

Tetrametilbenzidina (TMB). Estocar entre 2 e 8°C.

7 - Substrato B (S^B)

Solução de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Estocar entre 2 e 8°C.

8 - Solução de Parada



Ácido Clorídrico (HCl) 1N. Estocar entre 2 e 30°C.

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	96 TESTES
1- Padrões Referência	6 FRASCOS (A-F) X 1,0 mL
2- Conjugado Biotinizado	1 Frasco X 13 mL
3- Conjugado IgG	1 Frasco X 13 mL
4- Placa sensibilizada	1 Placa X 96 testes
5- Lavagem Concentrada	1 Frasco X 20 mL
6- Substrato A	1 Frasco X 7 mL
7- Substrato B	1 Frasco X 7 mL
8- Solução de Parada	1 Frasco X 8 mL

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais e insumos operacionais

- Reagentes descritos no quadro anterior
- Instruções de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1) Pipetas com capacidade de dispensar volumes de 25µL, 50 µL, com precisão maior que 1,5%.
- 2) Repipetadores para pipetagens repetitivas de volumes de 100 µL e 300 µL, com precisão maior que 1,5% (opcional) ou pipeta multicanal.
- 3) Lavadora de microplaca (opcional) ou pipetas para lavagem das microcavidades.
- 4) Leitora de ELISA com capacidade de absorvância em 450 / 630 nm de comprimento de onda.
- 5) Pipetas com volumes reguláveis (200 µL a 1000 µL) para diluição do Substrato.
- 6) Tubos de ensaio para a diluição dos substratos A e B.
- 7) Papel absorvente para secar as microcavidades.
- 8) Cronômetro ou relógio.
- 9) Frasco para estocar a solução de lavagem. após diluída
- 10) Água destilada ou deionizada.
- 11) Ferramentas de Controle de Qualidade.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte em temperaturas entre 15 e 30°C não deverá exceder a 72 (setenta e duas) horas. **Não congelar.** Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1 - Somente para uso diagnóstico *in vitro*;
- 2 - Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos;
- 3 - Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no invólucro de alumínio, vedar e estocar a 2-8°C.
- 4 - A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes;
- 5 - Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos e agentes oxidantes e redutores, que podem alterar de forma significativa os resultados;
- 6 - O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se os critérios de biossegurança de acordo com a legislação vigente.
- 7 - Toda matéria-prima do produto é testada e deve ser não reagente para HBsAg, Anti-HIV 1&2 e Anti HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação manual de todo produto que contém soro é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.
- 8- Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.
- 9 - Por medida de proteção, pode-se cobrir a placa durante a reação. Caso opte por este procedimento, é necessário que seja estabelecido como rotina.
- 10 - Assegurar que o fundo da cavidade esteja limpo e seco e que não haja bolhas na superfície do líquido antes de ler a placa. Não permitir que as cavidades sequem durante o ensaio.
- 11- Não exponha os reagentes, especialmente o substrato, à luz forte ou vapores de hipoclorito durante armazenamento ou etapas de incubação.
- 12-A Solução de Parada contém HCl, que é um ácido forte.

AMOSTRAS

Utilizar soro coletado em tubo sem aditivo.

Amostras hemolisadas ou altamente lipêmicas não devem ser usados.

As amostras podem ser conservadas sob refrigeração entre 2 e 8 °C, pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, podem ser estocadas por até 30 dias à temperatura de -20°C (freezer). Para amostras que serão testadas em duplicata, o volume requerido é de no mínimo 0,050 µL de soro.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

1) Solução de Lavagem:

Diluir o conteúdo do frasco nº 4 (Lavagem Concentrada (♦)) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Estocar em temperatura ambiente até a validade impressa no frasco original.

2) Substrato – Solução de Trabalho

Determinar a quantidade necessária de cavidades a serem utilizadas para preparo de uma quantidade adequada. Preparar a solução misturando partes iguais de Substrato A e Substrato B, 15 minutos antes de sua utilização. Mantenha-o protegido da luz até ser utilizado.

Para cada microcavidade (teste):

50µL de Substrato A + 50µL de Substrato B

Por exemplo: misture 1 mL de Substrato A e 1 mL de Substrato B para duas tiras de 8 microcavidades (16 testes). Ocorre sobre de reagente

TÉCNICA

Antes de iniciar o ensaio, colocar todos os reagentes, Amostras, Padrões Referência e Controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 - 30°C) por no mínimo 40 minutos.

Retornar as tiras da microplaca que não serão utilizadas para a embalagem original selada.

1. Separar as microcavidades a serem utilizadas considerando: Padrões, controles e Amostras (Podendo ser testados em duplicata.)
2. Separar a primeira cavidade para o Branco (OPCIONAL);
3. Pipetar 25 µL dos Padrões, Controles e Amostras em suas respectivas microcavidades;
- 4- Pipetar 100 µL do Anticorpo Biotinizado a cada Microcavidade;
- 5-Homogeneizar gentilmente durante ≠ 30 segundos;
- 6-Incubar por 30 minutos à Temperatura Ambiente;
- 7- Descartar o conteúdo das cavidades por aspiração (Lavadora) ou por decantação (manual);

Usar 300 µL aproximadamente de Solução de Lavagem previamente diluída, para efetuar um total de cinco (5) Ciclos de lavagem. Para a garantia da secagem da placa, ao final da lavagem, bater a placa por alguns segundos em papel absorvente;

Nota: Lavagem / secagem deficiente pode causar resultados inadequados.

8- Pipetar 100 µL de IgG Anti-Ferritina a cada microcavidade;

9- Homogeneizar gentilmente durante ≠ 30 segundos;

10- Incubar por 30 minutos à Temperatura Ambiente;

11- Repetir o item 7.

12- ATENÇÃO

siga um dos seguintes procedimentos:

A) Pipetar 100 µL de Substrato previamente preparado * Solução de Trabalho (A + B) em cada cavidade * Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

Ou,

B) Pipetar 50 µL de Substrato A em cada cavidade.

Pipetar 50 µL de Substrato B em cada cavidade.

13- Homogeneizar gentilmente durante ≠ 30 segundos.

14- Incubar por 15 minutos à Temperatura Ambiente ao abrigo da luz.

- 15- Pipetar 50 µL de Solução de Parada em cada microcavidade.
 16- Homogeneizar gentilmente durante ± 30 segundos.
 17- Ler: 450 nm (filtro primário) / 630 nm (filtro secundário) em até 30 minutos (no máximo).

CONTROLE DE QUALIDADE

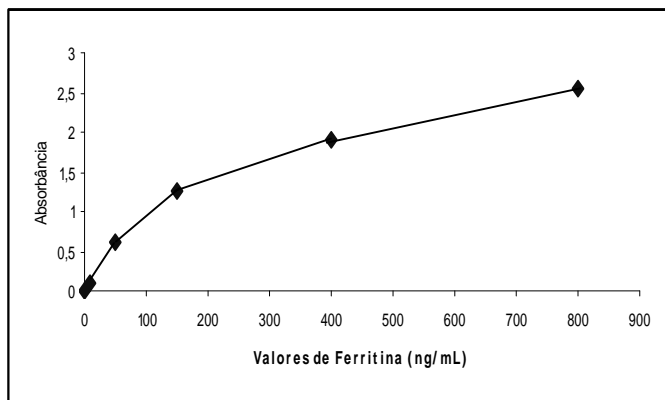
Cada laboratório deve testar controles nos níveis baixo, médio e alto para a monitoração do desempenho do teste. Estes controles devem ser tratados como amostras e serem determinados em cada bateria de testes realizados. As tabelas de controle de qualidade podem ser mantidas para monitorar o desempenho dos reagentes fornecidos. Podem ser adotados métodos estatísticos apropriados para equalizar os desvios. Desvios significantes das características de desempenho estabelecidas podem indicar uma alteração inesperada nas condições experimentais ou uma degradação dos kits reagentes. Devem ser utilizados reagentes novos para determinar a razão das variações.

RESULTADOS

Uma curva de calibração é utilizada para determinar a concentração de ferritina em amostras.

1. Registrar a absorbância obtida a partir da impressão da leitora de microplaca como especificado no Exemplo 1.
2. Construir uma curva de calibração utilizando a absorbância média para cada soro ensaiado em duplicata versus a correspondente concentração de ferritina em ng/mL em papel milimetrado.
3. Desenhar a melhor curva média entre os pontos. (Ver Figura 1).
4. Interpolares as concentrações do controle desconhecido ou a amostra de paciente na curva. (Ver Figura 1).

Figura 1



Exemplo 1

I.D	Microcav.	Absorb.	Absorb. média	Conc.
Cal A	A1	0,002	0,003	0
	B1	0,003		
Cal B	C1	0,110	0,112	10
	D1	0,113		
Cal C	E1	0,586	0,617	50
	F1	0,647		
Cal D	G1	1,204	1,262	150
	H1	1,320		
Cal E	A2	1,947	1,917	400
	B2	1,887		
Cal F	C2	2,586	2,561	800
	D2	2,536		
CTRL 1	E2	0,707	0,721	66,1
	F2	0,734		
Pacien- te 1	G2	1,289	1,287	154,0
	H2	1,285		
Pacien- te 2	A3	1,647	1,659	301,6
	B3	1,671		

*Os dados apresentados no exemplo 1 e Figura 1 são apenas ilustrativos e não devem ser utilizados no lugar de padrões em uma curva padrão construída a cada ensaio.

PARÂMETROS DE CONTROLES DE QUALIDADE

Para que os resultados do teste sejam considerados válidos, devem ser obedecidos os seguintes critérios.

1. A Absorbância (D.O.) do calibrador A deve ser <0,1
2. A Absorbância (D.O.) do calibrador F deve ser > 1,2

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

1. É importante que o tempo de reação em cada microcavidade seja constante para resultados reprodutíveis. O tempo para pipetar as amostras não deve ser superior a 10 minutos para evitar inadequação do teste. Se mais de uma placa for utilizada, recomenda-se repetir a curva de calibração.
2. A adição de solução de substrato inicia uma reação cinética, que termina pela adição da solução de parada. No entanto, a adição de substrato e a solução de parada deve ser realizada na mesma sequência para eliminar qualquer desvio de tempo durante a reação.
3. As leitoras de microplaca doseiam verticalmente. Não tocar o fundo da microcavidade
4. A falha em remover solução aderente adequadamente nas etapas de lavagem, aspiração e decantação podem causar uma duplicação deficiente dos resultados e resultados errôneos.
5. Amostras microbiologicamente contaminadas não devem ser utilizadas no teste. Também, amostras altamente lipêmicas ou hemolisadas não devem ser utilizadas.
6. Amostras com concentração de ferritina acima de 800 ng/mL devem ser diluídas com solução salina e testar novamente. A concentração da amostra é obtida multiplicando o resultado pelo fator de diluição.
7. Utilizar componentes do mesmo lote. Não intercambiar reagentes de lotes diferentes.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

A. Precisão

A precisão inter e intra-ensaio do BIOLISA FERRITINA foi determinada pela análise em três níveis diferentes em "pools" de soro de pacientes. O número, valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação para cada um destes controles são apresentados na Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 2

Precisão Intra-Ensaio (em ng/mL)

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (ng/mL)	185,9667	309,8333	373,0333
Desvio Padrão (ng/mL)	0,1258	0,1528	0,1756
Coefficiente de Variação (%)	0,0677	0,0493	0,0471

Tabela 3

Precisão Inter-Ensaio (em ng/mL)

	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Concentração (ng/mL)	113,0500	112,9500	113,0000
Desvio Padrão (ng/mL)	1,2763	1,4318	1,3377
Coefficiente de Variação (%)	1,1290	1,2676	1,1838

B. Sensibilidade

A sensibilidade do kit Biolisa Ferritina é 1,0 ng/mL.

C. Valores Esperados

As faixas de referência aproximadas para homens e mulheres adultos normais foram estabelecidas usando-se 400 amostras de soros normais e testando-se com o kit BIOLISA FERRITINA.

Adultos:

Homens 16-220 ng/mL
 Mulheres 10-124 ng/mL

Recém-Nascidos: 22-220 ng/mL

1 Mês – 2 Meses: 190-610 ng/mL

3 Meses – 5 Meses: 50-220 ng/mL

6 Meses – 16 Anos: 10-160 ng/mL

Estas faixas devem ser usadas apenas como diretrizes. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça suas próprias faixas para populações normais e anormais. Estas faixas sempre são dependentes do local, população, laboratório, técnica e especificidade do método.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

A ferritina é a mais importante proteína de reserva do ferro e é encontrada em todas as células, especialmente naquelas envolvidas na síntese de compostos férricos, no metabolismo e reserva do mesmo. A dosagem de ferritina é o mais fiel indicador da quantidade de ferro armazenada no organismo. Sua grande utilidade clínica está no diagnóstico diferencial entre as anemias hipocrômicas e microcíticas por deficiência de ferro, de anemias por outras etiologias. Nesses casos, a ferritina diminui antes das alterações dos níveis de ferro sérico e das alterações morfológicas da série vermelha. Entretanto, por fazer parte do grupo de proteínas de fase aguda, a ferritina se eleva em resposta a infecções, traumatismos e inflamações agudas. A elevação ocorre nas 24 a 48 horas iniciais, com um pico no terceiro dia, e se mantém por algumas semanas, o que pode dificultar sua interpretação. Seus níveis podem elevar-se no excesso de ferro, em pacientes transfundidos e em neoplasias, especialmente nas leucemias e linfomas e nos carcinomas de mama, fígado, pulmão, cólon e próstata. Elevam-se, também, nas anemias hemolíticas e megaloblásticas e nas lesões hepáticas, especialmente alcoólicas. Cerca de 25% dos pacientes com hepatite crônica têm aumento da ferritina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beamish, MR et al; "Transferrin iron, chelatable iron and ferritin in idiopathic hemochromatosis." Br. Jour. Haematology 27:219, 1974.
- Grace ND, Powell LW: "Iron storage disorders of the liver." Gastroenterology; 67:1257, 1974.
- Anonymous: "Adult screening for anemia and hemoglobinopathies." Nurse Pract. 20:48-51, 1995.
- Corti MC., Gaziano M., Hennekens CH.: "Iron status and risk of cardio-vascular disease." Ann. Epidemiol., 7:62-68, 1997.
- Edwards CQ., Kushmar Jp.: "Screening for hemochromatosis," NEJM., 32:1616-19, 1993.
- Jandal JH.: "Textbook of hematology." 2 ED. Philadelphia. Lippincott-Raven Pub, 1996.
- Jonxix JHP., Visser HKA.: "Determination of low percentage of fetal hemoglobin in the blood of normal children." Am. J. Dis. Child. 92:588-98, 1956.
- Jouanolle AM., David V., LeGail JY.: "Genetic Hemochromatosis." Ann. Biol. Clin. (Paris). 55:189-193, 1997.
- Lee GR, Ed.: Wintrobe's Clinical Hematology. Baltimore. Williams & Wilkins, 1996.
- Little DR.: "Hemochromatosis; Diagnosis and Management." Am. Fam. Physician. 53:2623-2658, 1996.
- Morikawa K, Oseko F., Morikawa S.: "A role for ferritin in Lymphoma and the immune system." Leukemia Lymphoma, 18:429-433, 1995.
- Naimark BJ., Reddy AE., Sawasky JA.: "Serum Ferritin and Heart Disease; The effect of moderate exercise on iron storage in postmenopausal women." Can. J. Cardiol., 12:1253-1257, 1996.
- Steiene-Martin EA., Lotspeich-Steininger CA., Koepke JÁ.: "Clinical Hematology: Principles, Procedures, Correlations." 2 Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997.
- Tietz N.: Textbook of clinical Chemistry. Carl A Burtis. 3 Ed. WB Saunders. Philadelphia. 1999.

GARANTIA DA QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes Bioclin são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

DADOS DO FABRICANTE

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
 Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
 CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
 Tel.: (31) 3439.5454 - Fax (31) 3439.5455
 e-mail bioclin@bioclin.com.br
 CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente Tel.: 0800 0315454.
 e-mail: sac@bioclin.com.br
 Número de registro do kit BIOLISA Ferritina na ANVISA: 10269360179

Revisão: Junho/2011