



Instructions for Use

Salivary Hepcidin ELISA

IVD



REF SLV-6082



96



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

Distributed by:



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

***Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.***

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabla de Contenidos

1	INTRODUCTION	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST	2
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3
4	REAGENTS.....	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	6
6	ASSAY PROCEDURE.....	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	8
8	QUALITY CONTROL.....	8
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	9
10	LIMITATIONS OF USE.....	10
11	LEGAL ASPECTS	11

1	EINLEITUNG	12
2	TESTPRINZIP	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	12
4	BESTANDTEILE DES KITS	13
5	PROBENVORBEREITUNG.....	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG	15
7	ERWARTETE WERTE	17
8	QUALITÄTSKONTROLLE	17
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA	18
10	GRENZEN DES TESTS	18
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	19

1	INTRODUCCIÓN.....	20
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO	20
3	PRECAUCIONES	20
4	COMPONENTES DEL KIT	21
5	MUESTRAS.....	23
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	23
7	VALORES ESPERADOS	25
8	CONTROL DE CALIDAD	25
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	26
10	LIMITACIONES DE USO	26
11	ASPECTOS LEGALES.....	27

12	REFERENCES / LITERATURE.....	28
----	------------------------------	----

	SYMBOLS USED	29
--	--------------------	----

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DRG Salivary Hepcidin ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of hepcidin in saliva.

1.2 Summary and Explanation

Hepcidin is an iron homeostasis regulator peptide. The bioactive peptide hepcidin-25 is generated predominantly in the liver by proteolytic cleavage of the C-terminal 25 amino acids of prohepcidin (1). Subsequent N-terminal processing of hepcidin-25 results in smaller peptides of 20-24 amino acids that show greatly reduced activity and accumulate in the urine (2).

Although originally identified as antimicrobial peptide (3), hepcidin-25 is now established as a major regulator of dietary iron absorption and cellular iron release (4). Hepcidin exerts its regulatory function by counteracting the function of ferroportin, the major cellular iron exporter in the membrane of macrophages, hepatocytes, and the basolateral site of enterocytes. Hepcidin-25 induces the internalization and degradation of ferroportin, resulting in increased intracellular iron stores, decreased dietary iron absorption, and decreased circulating iron concentrations (5). Hepatocellular hepcidin synthesis decreases under conditions of increased demand for circulating iron like iron deficiency, hypoxia, anemia, and erythropoiesis. In contrast, hepcidin synthesis is induced by inflammation and infection (6).

In serum, hepcidin-25 has shown to be a useful biomarker for diagnosis of various specific disease conditions (7-12). Besides its presence in serum, Hepcidin-25 was additionally confirmed to be present in human saliva (13). Determination of Hepcidin-25 in saliva has the advantage of a non-invasive and stress-free sample collection without the need of medical personnel.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG Salivary Hepcidin ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the **principle of competitive binding**.

The microtiter wells are coated with a monoclonal (mouse) antibody directed towards an antigenic site of the hepcidin molecule. Endogenous hepcidin in a patient sample competes with a hepcidin-biotin conjugate (*Enzyme Conjugate*) for binding to the coated antibody.

After incubation the microtiter plate is washed to stop the competition reaction. In the following incubation the bound biotin molecules are detected with streptavidin peroxidase (*Enzyme Complex*).

After incubation the plate is washed again.

Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of hepcidin in the patient sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-hepcidin antibody (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0 - 6)**, 7 vials, 1 mL each, lyophilized;
Concentrations: 0 – 250 – 500 – 1000 – 2000 – 4000 – 8000 pg/mL
Conversion: 1 pg/mL = 0.359 pmol/L
See “Reagent Preparation”.
Contain non-mercury preservative.
3. **Control Low & High**, 2 vials, 1 mL each, lyophilized;
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.
See “Reagent Preparation”.
Contain non-mercury preservative.
4. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
Hepcidin conjugated with biotin;
Contains non-mercury preservative.
5. **Enzyme Complex**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
Streptavidin conjugated to horseradish peroxidase
Contains non-mercury preservative.
6. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
Contains 0.5 M H₂SO₄,
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated);
See “Reagent Preparation”.

Note: Additional *Standard 0* for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm) (e.g. the DRG Instruments Microtiter Plate Reader)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Absorbent paper
- Distilled or deionized water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C - 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C - 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C - 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Standards

Reconstitute the lyophilized contents of each vial with 1 mL deionized water and let stand for at least 10 minutes at room temperature. Mix several times before use.

Note: *The reconstituted standards are stable for 2 days at 2 °C - 8 °C.
For longer storage aliquot and freeze at -20 °C.*

Controls

Reconstitute the lyophilized content of each vial with 1 mL deionized water and let stand for at least 10 minutes at room temperature. Mix the control several times before use.

Note: *The reconstituted controls are stable for 2 days at 2 °C - 8 °C.
For longer storage aliquot and freeze at -20 °C.*

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet, section 13.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DRG has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Saliva can be used in this assay.

Eating, drinking, chewing gums or brushing teeth should be avoided for 30 minutes before sampling. Otherwise, it is recommended to rinse mouth thoroughly with cold water 5 minutes prior to sampling.

Do not collect samples when oral diseases, inflammation or lesions exist (blood contamination).

If there is visible blood contamination in the patient specimen, it should be discarded. Rinse the sampling device with water, wait for 10 minutes and take a new sample.

Note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Saliva samples should be collected using SALI-TUBES 100 (REF SLV-4158).

Other saliva sampling devices have not been tested and should be validated under the responsibility of the user.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Fresh saliva samples

Immediately after arrival in the lab fresh saliva samples should be **frozen at least overnight at -20 °C**.

Each saliva sample has to be frozen, thawed, and centrifuged in order to separate the mucins by centrifugation.

Storage: immediately at -20 °C for up to 3 months.

Then samples must be thawed and centrifuged for 5 to 10 minutes at 10 000 *g*.

Thereafter, the clear supernatant must be transferred into a fresh tube.

Only this clear supernatant can be used as sample for the ELISA.

Supernatant

Storage: 2 days at 2 °C to 8 °C
up to 3 months at -20 °C

The supernatant should be frozen only once.

Thawed supernatant should be inverted several times prior to testing!

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and re-assayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL sample + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly)
b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **100 µL** of each **Standard, Control** and **sample (supernatant)** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **4 times** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well (if a plate washer is used) - or -
rinse the wells **4 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well for manual washing.
Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Dispense **100 µL Enzyme Complex** into each well.
7. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
8. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **4 times** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well (if a plate washer is used) - or -
rinse the wells **4 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well for manual washing.
Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
9. Add **100 µL of Substrate Solution** to each well.
10. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
11. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL of Stop Solution** to each well.
12. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using linear graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods). Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 8000 pg/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard		Optical Units (450 nm)
Standard 0	0 pg/mL	2.11
Standard 1	250 pg/mL	1.80
Standard 2	500 pg/mL	1.53
Standard 3	1000 pg/mL	1.20
Standard 4	2000 pg/mL	0.82
Standard 5	4000 pg/mL	0.52
Standard 6	8000 pg/mL	0.31

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently healthy individuals, using the DRG Salivary Hepcidin ELISA together with SALI-TUBES, the following data were observed:

Population	n	Mean (pg/mL)	Median (pg/mL)	2.5 th - 97.5 th Percentile (pg/mL)	Range (min. - max.) (pg/mL)
Males	42	1170	729	126 – 3778	< 68.4 – 6961
Females	98	862	493	< 68.4 – 3556	< 68.4 – > 8000

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 68.4 pg/mL to 8000 pg/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross-Reactivity)

The following substances were tested for cross-reactivity of the assay:

Substance	Added Conc. (pg/mL)	Measured Conc. (pg/mL)	Cross-reactivity (%)
Prohepcidin	1 000 000	0.0	0
17-OH Progesterone	2 000 000	0.0	0
Progesterone	2 400	0.0	0
DHEA	1 440	0.0	0
Testosterone	400	0.0	0
Cortisol	30 000	53	0.18
Estradiol	100	0.0	0

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DRG ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of the *Standard 0* and was found to be 68.4 pg/mL.

The Limit of Blank (LoB) is 54.16 pg/mL.

The Limit of Detection (LoD) is 73.87 pg/mL.

The Limit of Quantification (LoQ) is 87.71 pg/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability was determined by measuring each sample 10 times per run (n = 10):

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	10	292	8.8
2	10	1791	3.4
3	10	4062	5.1
4	10	6118	5.9

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability was determine by measuring each sample 10 times per run for 3 days (n = 30):

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	30	275	9.9
2	30	1621	10.2
3	30	3737	12.5
4	30	5559	9.3

9.4.3 Inter-Lot

The inter-assay (between-lots) variation was determined by measuring each sample 6 times with 3 different kit lots (n = 18):

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	18	400	7.5
2	18	791	5.1
3	18	1018	7.8
4	18	1149	1.8

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding hepcidin solutions with known concentrations.

The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of measured and expected values with 100.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Concentration in (pg/mL)		241	432	681	820
Average Recovery (%)		100.9	97.2	99.8	105.8
Range of Recovery (%)	from	85.5	94.4	93.3	98.3
	to	114.3	99.6	105.8	111.9

9.6 Linearity

Samples were measured undiluted and in serial dilutions from 1:2 to 1:16 with standard 0. The recovery (%) was calculated by multiplying the ratio of expected and measured values with 100.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Concentration (pg/mL)		1391	3222	3778	8218
Average Recovery (%)		97.2	91.7	93.3	99.1
Range of Recovery (%)	from	95.2	90.4	85.1	97.4
	to	100.6	94.4	103.8	100.1

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin up to 4 mg/mL has no influence on the assay results.

A biotin concentration of up to 1200 ng/mL in a saliva sample has no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of hepcidin in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

A High-Dose-Hook Effect is not known for competitive assays.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid.

Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

1 EINLEITUNG

Der **DRG Salivary Hepcidin ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Hepcidin in Speichel eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der DRG Salivary Hepcidin ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem **Prinzip der kompetitiven Bindung** basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine Antikörper-Bindungsstelle des Hepcidin-Moleküls gerichtet ist. Endogenes Hepcidin aus der Probe konkurriert mit dem Hepcidin-Biotin-Konjugat (*Enzyme Conjugate*) um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt und es folgt die Inkubation mit einem Streptavidin-Peroxidase-Enzymkomplex (*Enzyme Complex*). Nicht gebundener Enzymkomplex wird durch erneutes Waschen der Wells entfernt.

Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der Hepcidin-Konzentration in der Probe.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0,5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti-Hepsidin-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0 - 6)**, 7 Fläschchen, je 1 mL, lyophilisiert;
Konzentrationen: 0 – 250 – 500 – 1000 – 2000 – 4000 – 8000 pg/mL
Umrechnungsfaktor: 1 pg/mL = 0,359 pmol/L
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 1 mL, lyophilisiert;
Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Hepsidin mit Biotin konjugiert;
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Enzyme Complex** (Enzymkomplex), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Streptavidin mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.
7. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält 0,5 M H₂SO₄,
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
8. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C - 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 8 Wochen ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Standards

Das Lyophilisat in jedem Fläschchen mit 1 mL destilliertem Wasser auflösen und mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Vor der Verwendung mehrere Male mischen.

Achtung: Bei 2 °C - 8 °C sind die rekonstituierten Standards 2 Tage haltbar.
Für eine längere Aufbewahrung aliquotieren und bei -20 °C einfrieren.

Control

Das Lyophilisat in jedem Fläschchen mit 1 mL destilliertem Wasser auflösen und mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Vor der Verwendung mehrere Male mischen.

Achtung: Bei 2 °C - 8 °C sind die rekonstituierten Kontrollen 2 Tage haltbar.
Für eine längere Aufbewahrung aliquotieren und bei -20 °C einfrieren.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte Wash Solution (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Speichelproben können in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Der Patient sollte vor der Probennahme 30 Minuten nicht essen, trinken, Kaugummi kauen oder Zähne putzen. Andernfalls 5 Minuten vor der Probennahme den Mund gründlich mit kaltem Wasser spülen.

Speichelproben sollten nicht bei Krankheiten, Entzündungen oder Verletzungen der Mundhöhle entnommen werden (Blutkontamination).

Im Falle einer sichtbaren Kontamination mit Blut sollte die Probe verworfen werden. Das Probenbesteck wird mit Wasser gewaschen und nach 10 Minuten kann eine neue Probe genommen werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Die Speichelproben müssen mit SALI TUBES 100 (REF SLV-4158) gesammelt werden.

Andere Sammelsysteme wurden nicht getestet. Diese müssen in Verantwortung des Anwenders validiert werden.

5.2 Probenaufbewahrung und -vorbereitung

Frische Speichelproben

Sofort nach der Ankunft im Labor müssen frische Speichelproben **mindestens über Nacht bei -20 °C** tiefgefroren werden.

Jede Speichelprobe muss eingefroren, aufgetaut und anschließend zentrifugiert werden, um Muzine aus der Probe zu entfernen.

Lagerung: sofort bei -20 °C für bis zu 3 Monate

Die eingefrorene Probe muss aufgetaut und 5 bis 10 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert werden.

Anschließend muss der klare Überstand in ein frisches Röhrchen überführt werden.

Nur dieser klare Überstand darf als Probe im ELISA eingesetzt werden.

Überstand

Lagerung: 2 Tage bei 2 °C bis 8 °C
bis zu 3 Monate bei -20 °C

Der Überstand sollte nur einmal eingefroren werden.

Vor dem Einsatz im Test muss der aufgetaute Überstand durch hin und her schwenken gemischt werden.

5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µL Probe + 90 µL *Standard 0* gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (gründlich mischen).

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 100 µL Standard, Control und Probe (Überstand) mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.
Wells **4-mal** mit **400 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen, falls ein Waschautomat verwendet wird – oder -
Wells **4-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen bei manueller Durchführung-
Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
6. **100 µL Enzyme Complex** in jedes Well geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.
Wells **4-mal** mit **400 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen, falls ein Waschautomat verwendet wird – oder -
Wells **4-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen bei manueller Durchführung-
Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
9. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
10. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
12. Die Optische Dichte bei **450 ± 10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard		Optische Dichte (450 nm)
Standard 0	0 pg/mL	2,11
Standard 1	250 pg/mL	1,80
Standard 2	500 pg/mL	1,53
Standard 3	1000 pg/mL	1,20
Standard 4	2000 pg/mL	0,82
Standard 5	4000 pg/mL	0,52
Standard 6	8000 pg/mL	0,31

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

In einer Studie wurden die Proben von scheinbar gesunden Probanden mit SALI-TUBES gesammelt und mit dem DRG Salivary Hecpidin ELISA untersucht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

Population	n	Mittelwert (pg/mL)	Median (pg/mL)	2,5. - 97,5. Perzentile (pg/mL)	Bereich (min. - max.) (pg/mL)
Männer	42	1170	729	126 – 3778	< 68,4 – 6961
Frauen	98	862	493	< 68,4 – 3556	< 68,4 – > 8000

Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert werden.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 68,4 pg/mL bis 8000 pg/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die folgenden Substanzen wurden auf ihre Kreuzreaktivität im Assay getestet:

Substanz	Zugefügte Konz. (pg/mL)	Gemessene Konz. (pg/mL)	Kreuzreaktivität (%)
Prohepcidin	1 000 000	0,0	0
17-OH Progesteron	2 000 000	0,0	0
Progesteron	2 400	0,0	0
DHEA	1 440	0,0	0
Testosteron	400	0,0	0
Cortisol	30 000	53	0,18
Estradiol	100	0,0	0

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert, abzüglich der zweifachen Standardabweichung, des *Standard 0* (n = 20), beträgt 68,4 pg/mL.

Der „Limit of Blank“ (LoB) ist 54,16 pg/mL.

Die Nachweisgrenze (LoD) ist 73,87 pg/mL.

Die Quantifizierungsgrenze (LoQ) ist 87,71 pg/mL.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10 GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird.

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikation dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

Bis zu einer Konzentration von 4 mg/mL hat Hämoglobin keinen Einfluss auf die Testergebnisse.

Bis zu 1200 ng/mL hat Biotin in Speichelproben keinen Einfluss auf die Testergebnisse.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Bislang sind uns keine Substanzen (Medikamente) bekannt geworden, die einen Einfluss auf die Bestimmung von Hepcidin in einer Probe haben.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DRG Salivary Hcpidin ELISA** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del hepcidina en la saliva.

Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DRG Salivary Hcpidin ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el **principio de unión competitiva**.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo monoclonal dirigido contra un foci antigénico en la molécula hepcidina. En las muestras de los pacientes hepcidina compete con un conjugado hepcidina-biotina (*Enzyme Conjugate*) en la unión al anticuerpo inmovilizado.

Después de incubación, las placas se lavan para parar la reacción. En la siguiente incubación las moléculas de biotina unidas se detectan con la peroxidasa de rábano unida a la estreptavidina (*Enzyme Complex*).

Después de incubación se lava la placa por segunda vez.

Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de hepcidina en la muestra del paciente.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H₂SO₄ 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DRG Instruments GmbH.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-hepcidina (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0 - 6)**, (Estándar), 7 viales, 1 mL cada, liofilizados; Concentraciones: 0 – 250 – 500 – 1000 – 2000 – 4000 – 8000 pg/mL
Conversión: 1 pg/mL = 0,359 pmol/L
Ver “Preparación de los Reactivos”.
Contiene conservante sin mercurio.
3. **Control Low & High** (Control), 2 viales, 1 mL cada, liofilizados; Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC.
Ver “Preparación de los Reactivos”.
Contiene conservante sin mercurio.
4. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 14 mL, listo para usar; Hecpidina conjugado con la biotina;
Contiene conservante sin mercurio.
5. **Enzyme Complex** (Complejo enzimático), 1 vial, 14 mL, listo para usar; Estreptavidina conjugado con la peroxidasa de rábano;
Contiene conservante sin mercurio.
6. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar; Tetrametilbencidina (TMB).
7. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar; Contiene 0.5 M H₂SO₄,
Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
8. **Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X);
Ver “Preparación de los Reactivos”.

Nota: Se puede solicitar el *Standard 0* para la dilución de la muestra.

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ± 10 nm) (ej. DRG Instruments Microtiter Plate Reader)
- Micropipetas de precisión variable calibradas
- Papel absorbente
- Agua destilada

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante 8 semanas si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Standards

Reconstituya el contenido liofilizado de cada tubo con 1 mL de agua destilada y espere al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Mezcle varias veces antes de usar.

Nota: *Los estándares reconstituidos son estables durante 2 días a 2 °C - 8 °C.
Para períodos más largos alícuota y congelar a -20 °C.*

Control

Reconstituya el contenido liofilizado de cada tubo con 1 mL de agua destilada y espere al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Mezcle varias veces antes de usar.

Nota: *El control reconstituido es estable durante 2 días a 2 °C - 8 °C.
Para períodos más largos alícuota y congelar a -20 °C.*

Wash Solution

Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL. La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DRG, no mas tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

Se pueden usar muestras de saliva en este ensayo.

Evitar: comer, beber, tomar chicles o limpiarse los dientes, al menos 30 minutos antes de la recogida de la muestra. Por el contrario, se recomienda enjuagarse la boca a fondo con agua fría 5 minutos antes de la recogida de la muestra.

No recoger muestras cuando hay enfermedades bucales, inflamación o lesiones (contaminación por sangre) de la boca. Si existe una contaminación por sangre visible en la muestra del paciente, ésta debe ser descartada, enjuagar el aparato de recogida de muestra con agua, esperar 10 minutos y recoger una nueva muestra.

Nota: No deben utilizarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Recogida de la muestra

Las muestras de saliva deben recogerse utilizando SALI-TUBES 100 (REF SLV-4158).

Otros dispositivos de muestreo de saliva no se han probado y deben validarse bajo la responsabilidad del usuario.

5.2 Almacenamiento y preparación de muestras

Muestras de saliva fresca

Inmediatamente después de llegar al laboratorio, las muestras de saliva fresca deben **congelarse al menos durante la noche a -20 °C**.

Cada muestra de saliva debe congelarse, descongelarse y centrifugarse para separar las mucinas por centrifugación.

Almacenamiento: inmediatamente a -20 °C hasta un máximo de 3 meses.

Luego, las muestras deben descongelarse y centrifugarse durante 5 a 10 minutos 10 000 g.

A partir de entonces, el sobrenadante transparente debe transferirse a un tubo nuevo.

Solo este sobrenadante transparente se puede utilizar como muestra para el ELISA.

Sobrenadante

Almacenamiento: 2 días de 2 °C a 8 °C
hasta 9 meses a -20 °C

El sobrenadante se debe congelar solo una vez.

¡El sobrenadante descongelado debe invertirse varias veces antes de la prueba!

5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Standard 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

- a) dilución 1:10: 10 µL muestra + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente)
b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente).

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **100 µL** de cada **Standard, Control y muestra (sobrenadante)** con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo.
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **60 minutes** a temperatura ambiente.
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos **4 veces** con **400 µL Wash Solution** diluida por pocillo, si se utiliza un lavador de placas - o -
Lavar los pocillos **4 veces** con **300 µL Wash Solution** diluida por pocillo para el lavado manual.
Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
Nota importante: La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
6. Dispensar **100 µL** de **Enzyme Complex** a cada pocillo.
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
7. Incubar durante **30 minutes** a temperatura ambiente.
8. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos **4 veces** con **400 µL Wash Solution** diluida por pocillo, si se utiliza un lavador de placas - o -
lavar los pocillos **4 veces** con **300 µL Wash Solution** diluida por pocillo para el lavado manual.
Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
9. Adicionar **100 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
10. Incubar durante **15 minutes** a temperatura ambiente.
11. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
12. Leer la OD a **450 ± 10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la **Stop Solution**.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestras puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar		Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 0	0 pg/mL	2,11
Standard 1	250 pg/mL	1,80
Standard 2	500 pg/mL	1,53
Standard 3	1000 pg/mL	1,20
Standard 4	2000 pg/mL	0,82
Standard 5	4000 pg/mL	0,52
Standard 6	8000 pg/mL	0,31

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio llevado a cabo con individuos aparentemente sanos, usando el DRG Salivary Hepcidin ELISA en combinación con SALI-TUBES, se obtuvieron los siguientes valores:

Población	n	Media (pg/mL)	Mediana (pg/mL)	Percentil 2,5 - 97,5 (pg/mL)	Rango (min. - max.) (pg/mL)
Hombres	42	1170	729	126 – 3778	< 68,4 – 6961
Mujeres	98	862	493	< 68,4 – 3556	< 68,4 – > 8000

Los resultados obtenidos no deberían ser el único motivo para una intervención terapéutica. Los resultados han de correlacionarse con otras observaciones clínicas y tests de diagnóstico.

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico. Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos arriba mencionado sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DRG directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 68,4 pg/mL a 8000 pg/mL.

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Las siguientes sustancias se midieron para determinar la reactividad cruzada en el ensayo:

Sustancia	Conc. añadida (pg/mL)	Conc. medida (pg/mL)	Reactividad cruzada (%)
Prohepcidin	1 000 000	0,0	0
17-OH Progesterona	2 000 000	0,0	0
Progesterona	2 400	0,0	0
DHEA	1 440	0,0	0
Testosterona	400	0,0	0
Cortisol	30 000	53	0,18
Estradiol	100	0,0	0

9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media menos dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del *Standard 0* y resultó ser 68,4 pg/mL.

El límite del blanco (LoB) es 54,16 pg/mL.

El Límite de Detección (LoD) es 73,87 pg/mL.

El Límite de Cuantificación (LoQ) es 87,71 pg/mL.

Para información sobre

9.4 Precisión

9.5 Recuperación

9.6 Linealidad

por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

10 LIMITACIONES DE USO

Únicamente se obtendrán resultados fiables y reproducibles, cuando el procedimiento del ensayo se realice entendiendo las instrucciones de uso correctamente y desarrollando buenas prácticas de laboratorio.

Cualquier manejo impropio de las muestras o modificación del test puede influenciar los resultados.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina hasta 4 mg/mL no afecta los resultados del ensayo.

Biotina hasta 1200 ng/mL en una muestra de saliva no afecta los resultados del ensayo.

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de hcpidina en una muestra.

10.3 Efecto de Alta Concentración (Gancho)

No se ha observado efecto gancho en este ensayo.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DRG.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Scamuffa N, et al. Regulation of prohepcidin processing and activity by the subtilisin-like proprotein convertases Furin, PC5, PACE4 and PC7. *Gut*. 2008; 57(11):1573-82.
2. Kemna EH, Tjalsma H, Podust VN, Swinkels DW. Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. *Clin. Chem.* 2007; 53(4):620-8.
3. Krause A et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 2000; 480(2-3):147-50.
4. Kroot J et al. Heparin in Human Iron Disorders: Diagnostic Implications. *Clin. Chem.* 2011; 57:121650–1669.
5. Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol.* 2009; 122(2-3):78-86.
6. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell*. 2010; 142:24 –38.
7. Swinkels DW, Jorna AT, Raymakers RA. Synopsis of the Dutch multidisciplinary guideline for the diagnosis and treatment of hereditary haemochromatosis. *Neth. J. Med.* 2007; 65(11):452-5.
8. Camaschella C, Silvestri L. Molecular mechanisms regulating hepcidin revealed by hepcidin disorders. *Scientific World Journal*. 2011; 11:1357-66.
9. Girelli D et al. Reduced serum hepcidin levels in patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2009; 51(5):845-52.
10. Gardenghi S et al. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by downregulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood*. 2007; 109:5027–35.
11. Uehata T et al. Serum hepcidin-25 levels and anemia in non-dialysis chronic kidney disease patients: a cross-sectional study. *Nephrol Dial. Transplant.* 2012; 27(3):1076-83.
12. Peeling P, Dawson B, Goodman C, Landers G, Trinder D. Athletic induced iron deficiency: new insights into the role of inflammation, cytokines and hormones. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2008; 103: 381–91.
13. Arnold, Jayantha, et al. "Presence of hepcidin-25 in biological fluids: bile, ascitic and pleural fluids." *World journal of gastroenterology: WJG* 16.17 (2010): 2129

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen / Anzahl	Volume / Quantità	Volumen / Número	Volume / Quantité
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Micropozzetti	Placas multipocillo	Plaques de micro-titration
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisiero	Antisero	Antisérum
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Tracciante enzimatico	Conjugado enzimático	Conjugué enzymatique
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complesso enzimatico	Complejo enzimático	Complexe enzymatique
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Soluzione di substrato	Solución de sustrato	Solution substrat
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Soluzione d' arresto	Solución de parada	Solution d'arrêt
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard zero	Estándar cero	Zero Standard
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Controllo	Control	Contrôle
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampone del test	Tampón de ensayo	Tampon d'essai
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Soluzione di lavaggio	Solución de lavado	Solution de lavage
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl		1 N HCl	1N HCl
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungs-medium	Diluyente dei campioni	Solución para dilución de la muestra	Solution pour dilution de l'échantillon
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungs-medium	Diluyente del tracciante	Solución para dilución del conjugado	Solution pour dilution du conjugué