

研究用



User's Manual



Hepcidin Prohormone ELISA

FRO

REF

EIA-4644 (formerly EIA-4015)



Legal Manufacturer:



DRG Instruments GmbH, Germany
Division of DRG International, Inc
Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg

Telefon: +49 (0)6421-17000 Fax: +49-(0)6421-1700 50

Internet: www.drg-diagnostics.de

E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社



User's Manual



96



01/07



Legal Manufacturer:



DRG Instruments GmbH, Germany
Division of DRG International, Inc
Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg

Telefon: +49 (0)6421-17000 Fax: +49-(0)6421-1700 50

Internet: www.drg-diagnostics.de

E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:



人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido / Content

1	INTRODUCTION	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST	2
3	PRECAUTIONS.....	2
4	KIT COMPONENTS	3
5	SPECIMEN.....	4
6	TEST PROCEDURE.....	4
7	EXPECTED VALUES	6
8	ASSAY CHARACTERISTICS.....	6
9	LIMITATIONS OF USE.....	7
10	LEGAL ASPECTS	8
11	REFERENCES	8

1	INTRODUCTION	27
2	PRINCIPE DU TEST.....	27
3	PRECAUTIONS D'UTILISATION.....	27
4	COMPOSITION DU KIT.....	28
5	ECHANTILLON.....	29
6	RÉALISATION DU TEST	30
7	VALEURS ATTENDUES.....	31
8	CARACTERISTIQUES DU TEST	31
9	LIMITES D'UTILISATION.....	32
10	ASPECTS LEGAUX.....	32
11	REFERENCES	32

1	EINLEITUNG	9
2	TESTPRINZIP	9
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	9
4	BESTANDTEILE DES KITS	10
5	PROBENVORBEREITUNG.....	11
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	12
7	ERWARTETE WERTE	13
8	ASSAY CHARACTERISTIKA	13
9	GRENZEN DES TESTS	14
10	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	14
11	REFERENZEN	14

SYMBOLS USED WITH DRG ELISA'S	33
-------------------------------------	----

1	INTRODUZIONE	15
2	PRINCIPIO DEL TEST	15
3	PRECAUZIONI	15
4	COMPONENTI DEL KIT	16
5	CAMPIONI.....	17
6	ATTUAZIONE DEL TEST	17
7	VALORI NORMALI	19
8	CARATTERISTICHE DEL TEST	19
9	LIMITAZIONE DEL TEST	20
10	ASPETTI LEGALI	20
11	BIBLIOGRAFIA.....	20

1	INTRODUCCIÓN.....	21
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO	21
3	PRECAUCIONES	21
4	COMPONENTES DEL KIT	22
5	MUESTRAS.....	23
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	23
7	VALORES ESPERADOS	25
8	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	25
9	LIMITACIONES DE USO.....	26
10	ASPECTOS LEGALES.....	26
11	REFERENCIAS	26

1 INTRODUCTION

The DRG Hepcidin Prohormone Enzyme Immunoassay Kit provides materials for the quantitative determination of Hepcidin Prohormone in human serum.

This assay is intended for research use only.

Hepcidin is a small cystein-rich peptide produced in the liver [1]. This molecule regulates the absorption of iron in the body similarly to the correlation of insulin and sugar.

Hepcidin was initially isolated as a 25 amino acid (aa) peptide in human plasma and urine exhibiting antimicrobial activity [2,3].

Human Hepcidin is produced from a 84 aa precursor including a putative (24 aa) signal peptide.

Application of the present ELISA allows the detection and determination of Hepcidin Prohormone (Pro-Hepcidin) in serum of patients suffering from several disorders of iron metabolism.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

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

The microtiter wells are coated with a polyclonal antibody directed towards an antigenic site on the Hepcidin Prohormone molecule (28-47 aa). Endogenous Hepcidin Prohormone of a patient sample competes with a Hepcidin Prohormone-biotin conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound biotin conjugate is reverse proportional to the concentration of Hepcidin Prohormone in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is reverse proportional to the concentration of Hepcidin Prohormone in the patient sample.

3 PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. This assay is intended for research use only.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets.
- 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.
- Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
- 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.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according the national biohazard safety guideline or regulation.
- Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG Instruments GmbH. The Safety Data Sheets fit the demands of: EU-Guideline 91/155 EC.

4 KIT COMPONENTS

4.1 Contents of the Kit

1. **Microtiterwells**, 12x8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti Pro-Hepcidin antibody (polyclonal).
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 vials (lyophilized), 1 mL;
Concentrations: 10, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/mL of synthetic peptide Hepcidin (28-47).
Contains < 0.02% methylisothiazolone and < 0.02% bromonitrodioxane as preservative.
See „Preparation of Reagents“;
3. **Control**, 1 vial (lyophilized), 1 mL,
Control value and range please refer to vial label or QC-Datasheet.
see „Reagent Preparation“
Contains < 0.02% methylisothiazolone and < 0.02% bromonitrodioxane as preservative.
4. **Assay Buffer**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
contains < 0.02% methylisothiazolone and < 0.02% bromonitrodioxane as preservative.
5. **Biotin Conjugate**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
Pro-Hepcidin fragment conjugated to biotin;
contains < 0.02% methylisothiazolone and < 0.02% bromonitrodioxane as preservative.
6. **Enzyme Complex**, 1 vial, 14mL, ready to use,
contains horseradish Peroxidase,
contains < 0.02% methylisothiazolone and < 0.02% bromonitrodioxane as preservative.
7. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
Tetramethylbenzidine (TMB).
8. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;
contains 0.5M H₂SO₄.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
9. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated);
see „Preparation of Reagents“.

4.1.1 Equipment and material 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.
- Aqua dest.

4.2 Storage and stability of the Kit

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

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

Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.3 Preparation of Reagents

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

Standards

Reconstitute the lyophilized contents of the standard vial with 1.0 mL Aqua dest.

Note: The reconstituted standards are stable for 6 days at 2-8°C. For longer storage freeze at -20°C.

Control

Reconstitute the lyophilized content with 1.0 mL Aqua dest. and let stand for 10 minutes in minimum. Mix the control several times before use.

Note: The reconstituted control is stable for 6 days at 2-8°C. For longer storage freeze at -20°C.

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.

4.4 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 Material Safety Data Sheets (see chapter 13).

4.5 Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, DRG have to be informed written, 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

Serum can be used in this assay.

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

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

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), allow to clot, and separate serum by centrifugation at 2500 x g for 10 min at 4°C. Aliquots should be stored at -20°C.

For other sample material a special extraction protocol may be necessary.

5.2 Specimen Storage

Specimens should be capped and may be stored for up to 24 hours at 2-8°C prior to assaying. Specimens held for a longer time should be frozen only once at -20°C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

Note: *Samples from patients which were frozen for a longer period or which were repeatedly thawed show higher Pro-Hepcidin concentrations than freshly collected samples which were frozen only once.*

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 *Assay Buffer* and reassayed 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 Serum + 90 µL *Assay Buffer* (mix thoroughly)
- b) Dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Assay Buffer* (mix thoroughly).

6 TEST 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 Assay Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the holder.
2. Dispense **100 µl** of *Assay Buffer* into appropriate wells.
3. Dispense **50 µl** of each *Standard*, *Control* and samples with new disposable tips into appropriate wells.
4. Dispense **100 µl** *Biotin Conjugate* into each well.
5. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
6. Incubate for **120 minutes** at room temperature (without covering the plate).
7. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells 5 times with diluted *Wash Solution* (400 µl per well). 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!
8. Add **100 µl** of *Enzyme Complex* to each well.
9. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
10. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells 5 times with diluted *Wash Solution* (400 µl per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
11. Add **100 µl** of *Substrate Solution* to each well.
12. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
13. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µl** of *Stop Solution* to each well.
14. Read the OD at **450±10 nm** with a microtiter plate reader **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. 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 IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 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. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Below is listed a typical example of a standard curve with the DRG Hepcidin Prohormone ELISA.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	1.85
Standard 1 (10 ng/mL)	1.72
Standard 2 (50 ng/mL)	1.38
Standard 3 (100 ng/mL)	1.16
Standard 4 (250 ng/mL)	0.82
Standard 5 (500 ng/mL)	0.63
Standard 6 (1000 ng/mL)	0.48

7 EXPECTED VALUES

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

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DRG Hepcidin Prohormone ELISA the following values are observed:

Population	Valid N	5% - 95 % Percentile	Mean	Median
males and females	80	58.9 – 158.1	104.5	92.2

8 ASSAY CHARACTERISTICS

8.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0 – 1000 ng/mL.

8.2 Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity was calculated from the mean minus two standard deviations of twenty one (21) replicate analyses of *Standard 0* and was found to be < 3.95 ng/mL.

8.3 Precision

8.3.1 Intra Assay Variation

The within assay variability is shown below:

Sample	n	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)
1	12	426.7 ± 20.2	4.69
2	12	210.7 ± 8.58	4.07
3	12	110.7 ± 4.74	4.28

8.3.2 Inter Assay Variation

The between assay variability is shown below:

Sample	n	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)
1	23	431.96 ± 20.8	4.82
2	23	216.17 ± 14.44	6.68
3	23	109.8 ± 10.72	9.76

8.4 Accuracy

8.4.1 Quality Control

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.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy 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.

8.4.2 Recovery

The analytical recovery of Pro-Hepcidin was estimated at 3 different concentrations in serum samples. Increasing amounts of unlabeled Pro-Hepcidin (50 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml) were added to the samples with various initial Pro-Hepcidin concentrations. Each sample (non spiked and spiked) was assayed. The Pro-Hepcidin concentrations were measured and the percentage recovery rates were calculated.

Serum	Endogenous Pro-Hepcidin (ng/mL)	Average Recovery (%)	Range of Recovery (%)
1	273.8	93.1	91.8-94.3
2	116.8	94.7	89.2-98.7
3	82.3	97.1	94.5-105.7

8.4.3 Linearity

The linearity of the assay was evaluated by diluting of the samples (serum) having different Pro-Hepcidin levels with *Assay Buffer*. The Pro-Hepcidin content in the diluted samples was assayed by the ELISA. Three dilutions were performed for each sample and the percentage recovery rates were calculated.

Serum	Endogenous Pro-Hepcidin (ng/mL)	Average Recovery (%)	Range of Recovery (%)
1	591.6	99.1	90.6-108.2
2	157.5	107.9	106.3-107.2
3	179.4	104.6	92.3-111.6

9 LIMITATIONS OF USE

9.1 Interfering Substances

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

9.2 Drug Interferences

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

9.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

10 LEGAL ASPECTS

10.1 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.

10.2 Therapeutical Consequences

Therapeutical consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 10.1. 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 therapeutical consequences be derived.

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

10.3 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 10.2. 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.

11 REFERENCES

1. Kulaksiz H, et al. Pro-hepcidin: expression and cell-specific localization in the liver and its regulation in hereditary hemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anemia. GUT 2004; 53: 735-743
2. Krause A, Neitz S, Magert HJ, et al. LEAP-1, a novel highly-disulfide bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. FEBS Lett 2000; 480: 147-150
3. Park CH, Valore EV, Waring AJ, et al. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. J Biol Chem 2001; 276: 7806-7810

1 EINLEITUNG

Der **DRG Hepcidin Prohormone ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Hepcidin-Prohormon in Humanserum eingesetzt.

Nur für Forschungszwecke.

2 TESTPRINZIP

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

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine Antikörper-Bindungsstelle des Hepcidin-Prohormon-Moleküls (28-47 aa) gerichtet ist.

Während der Inkubation konkurriert das Hepcidin-Prohormon aus der Probe mit dem Hepcidin-Prohormon-Biotinkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch 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-Prohormon-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für Forschungszwecke.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- 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.
- Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich. Die Materialsicherheitsdatenblätter entsprechen den Verordnungen der EU-Richtlinie 91/155 EC.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12x8 Wells (einzeln brechbar); mit anti- Pro-Hepcidin-Antikörper (polyklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 Fläschchen (lyophilisiert), je 1,0 mL; Konzentrationen: 10, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/mL synthetisches Peptide Hepcidin (28-47). Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“. Enthält < 0,020 % Methylisothiazolon und < 0,020 % Bromnitrodioxan als Konservierungsstoff.
3. **Control** (Kontrolle), 1 Fläschchen (lyophilisiert), 1,0 mL; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“. Enthält < 0,020 % Methylisothiazolon und < 0,020 % Bromnitrodioxan als Konservierungsstoff. Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.
4. **Assay Buffer** (Assaypuffer), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig. Enthält < 0,020 % Methylisothiazolon und < 0,020 % Bromnitrodioxan als Konservierungsstoff.
5. **Biotin Conjugate** (Biotinkonjugat), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Prohepcidinfragment mit Biotin konjugiert. Enthält < 0,020 % Methylisothiazolon und < 0,020 % Bromnitrodioxan als Konservierungsstoff.
6. **Enzyme Complex** (Enzymkomplex), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig. Enthält Meerrettichperoxidase. Enthält < 0,020 % Methylisothiazolon und < 0,020 % Bromnitrodioxan als Konservierungsstoff.
7. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
8. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Enthält 0,5M H₂SO₄. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
9. **Wash Solution** (Waschlösung), **40X** konzentriert, 1 Fläschchen, 30 mL; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

4.1.1 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450±10 nm Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.

4.2 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

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

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

4.3 Vorbereitung der Reagenzien

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

Standards

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Standardfläschchen mit 1,0 mL destilliertem Wasser.

Achtung: Bei 2-8°C sind die rekonstituierten Standards 6 Tage haltbar. Für eine längere Aufbewahrung bei -20°C einfrieren.

Control

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt des Fläschchens mit 1,0 mL destilliertem Wasser und lassen Sie das Fläschchen mindestens 10 Minuten ruhen. Vor Gebrauch die Kontrolle mehrmals vorsichtig schütteln.

Achtung: Bei 2-8°C ist die rekonstituierte Kontrolle 6 Tage haltbar. Für eine längere Aufbewahrung bei -20°C einfrieren.

Wash Solution

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

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

4.4 Entsorgung des Kits

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

4.5 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

Serum kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

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

5.1 Probenentnahme**Serum:**

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette # 02.1388.001), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation (2500 x g, 10 Minuten bei 4 °C) abtrennen.

Aliquots müssen bei -20 °C eingefroren werden.

Für anderes Probenmaterial kann eine spezielle Extraktion erforderlich sein.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 24 Stunden bei 2-8°C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung sollten die Proben eingefroren bei -20° C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

ACHTUNG: Bei Patientenproben, die über einen längeren Zeitraum oder mehrfach eingefroren waren, ergeben sich höhere Pro-Hepcidin-Konzentrationen als bei frisch gewonnenen Proben, die nur einmal eingefroren wurden.

5.3 Probenverdünnung

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

Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Serum + 90 µL Assay Buffer gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL Assay Buffer (gründlich mischen).

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt 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. **100 µL** Assay Buffer in jedes Well geben.
3. **Je 50 µL** Standards, Control und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
4. **100 µL** Biotin Conjugate in jedes Well geben.
5. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
6. **120 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren. (Platte nicht abdecken.)
7. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 5mal mit verdünnter Waschlösung waschen. 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 Waschschrittes!
8. **100 µL** Enzyme Complex in jedes Well geben.
9. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
10. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells 5mal mit verdünnter Waschlösung waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
11. **100 µL** Substrate Solution in jedes Well geben.
12. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
13. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL** Stop Solution in jedes Well abstoppen.
14. 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 Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. 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.

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG Hepcidin Prohormone ELISA gezeigt:

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	1,85
Standard 1 (10 ng/mL)	1,72
Standard 2 (50 ng/mL)	1,38
Standard 3 (100 ng/mL)	1,16
Standard 4 (250 ng/mL)	0,82
Standard 5 (500 ng/mL)	0,63
Standard 6 (1000 ng/mL)	0,48

7 ERWARTETE WERTE

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

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DRG Hepcidin Prohormone ELISA folgende Werte:

Population	N	5% - 95 % Perzentile	Mittelwert	Median
Männer und Frauen	80	58,9 – 158,1	104,5	92,2

8 ASSAY CHARACTERISTIKA

8.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0 – 1000 ng/mL.

8.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

8.3 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des *Standards 0* (n = 21), beträgt < 3,95 ng/mL.

8.4 Präzision

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

8.5 Testgenauigkeit

8.5.1 Qualitäts-Kontrolle

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 wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

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.

Die Daten zu:

8.5.2 Wiederfindung

8.5.3 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9 GRENZEN DES TESTS

9.1 Interferenzen

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

9.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des Hepcidin Prohormon-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

9.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

10 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

10.1 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.

10.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 10.1. 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.

10.3 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 10.2. 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.

11 REFERENZEN

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **DRG Hepcidin Prohormone ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di proormone epcidina in siero.

Solo a scopo di ricerca.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test Hepcidin Prohormone ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA), basato sul principio del legame competitivo.

I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo policlonale diretto contro un unico sito antigenico della molecola proormone epcidina (28-47 aa). Una quantità ignota di pro-epcidina presente nel campione e una quantità fissa di epcidina (28-47) coniugata alla biotina competono per i siti di legame dell'anticorpo pro-epcidina immobilizzato sui pozzetti. Dopo l'incubazione il coniugato non legato è lavato via.

La quantità della coniugata legata è inversamente proporzionale alla concentrazione di proormone epcidina nel campione. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di proormone epcidina nel campione del paziente.

3 PRECAUZIONI

- Solo a scopo di ricerca.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0.5 M H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati magazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DRG Instruments GmbH. I regolamenti di sicurezza corrispondono alle norme EU 91/155 EC.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12x8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti
Pozzetti ricoperti con l'anti-proormone epcidina anticorpo (policlonale)
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 flaconi (liofilizzati), 1 mL
Concentrazione: 10, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/mL (synthetic peptide Hepcidin (28-47)).
vedi "preparazione dei reagenti"
Contiene < 0,02% methylisithiazolone, < 0,02% bromonitrodioxane come conservante.
3. **Control** (Controllo), 1 flacone (liofilizzato), 1 mL
I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei flaconi o sulla descrizione QC.
vedi „preparazione dei reagenti“
Contiene < 0,02% methylisithiazolone, < 0,02% bromonitrodioxane come conservante.
4. **Assay Buffer** (Tampone del test), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso
Contiene < 0,02% methylisithiazolone, < 0,02% bromonitrodioxane come conservante.
5. **Biotin Conjugate** (Tracciante biotinilato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso
frammento della pro-epcidina coniugato alla biotina.
Contiene < 0,02% methylisithiazolone, < 0,02% bromonitrodioxane come conservante..
6. **Enzyme Complex** (Complesso enzimatico), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso
Contiene perossidasi di rafano,
Contiene < 0,02% methylisithiazolone, < 0,02% bromonitrodioxane come conservante.
7. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso
TMB (benzidine tetrametilico)
8. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
contiene 0.5M H₂SO₄
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
9. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X)
vedi „preparazione dei reagenti“

4.1.1 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450±10 nm)(p.es. il DRG Instruments Microtiterplate Reader).
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.

4.2 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2-8°C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2-8°C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2-8°C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per due mesi se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.3 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Standards

Ricostituire il contenuto liofilizzato dei flaconi con gli standard con 1,0 mL acqua distillata.

Nota: Gli standard ricostituiti sono stabili per 6 giorni a 2-8°C. Per periodi piu' lunghi congelare a -20°C.

Control

Ricostituire il contenuto liofilizzato con 1,0 mL acqua distillata e far riposare per almeno 10 minuti.

Mescolare alcune volte prima dell'uso.

Nota: Il controllo ricostituito è stabile per 6 giorni a 2-8°C. Per periodi piu' lunghi congelare a -20°C.

Wash Solution

Diluire 30 mL della soluzione di lavaggio concentrata con 1170 mL di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 mL.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.

4.4 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

4.5 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DRG, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero può essere usato per questo test.

Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

5.1 Collezione dei campioni**Siero:**

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), far coagulare e separare il siero centrifugando (2500 x g, 10 min. a 4°C).

Per materiali diversi di campioni un protocollo speciale di estrazione può essere necessario.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 24 ore a 2-8°C.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo dovrebbero essere congelati solo una volta a -20°C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

Nota bene: *Campioni congelati per un lungo periodo o ripetutamente scongelati portano a concentrazioni di epcidina più alte rispetto a campioni freschi congelati solo una volta.*

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con *Assay Buffer* e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL siero + 90 µL *Assay Buffer* (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Assay Buffer* (agitare bene).

6 ATTUAZIONE DEL TEST**6.1 Indicazioni generali**

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Esecuzione del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **100 µL** *Assay Buffer* in ogni pozzetto.
3. Pipettare **50 µL** di ogni *Standard*, *Control* e campione nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
4. Pipettare **100 µL** *Biotin Conjugate* in ogni pozzetto.
5. Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
6. Incubare per **120 minuti** a temperatura ambiente (senza coprire la piastra).
7. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti 5 volte con soluzione di lavaggio diluita (400 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante:
La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esecimento del lavaggio!
8. Pipettare **100 µL** *Enzyme Complex* in ogni pozzetto.
9. Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente.
10. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti 5 volte con soluzione di lavaggio diluita (400 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
11. Aggiungere **100 µL** della *Substrate Solution* ad ogni pozzetto.
12. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
13. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della *Stop Solution* ad ogni pozzetto.
14. Determinare la densità ottica a **450 ± 10 nm** con un fotometro per microtiter-piastre **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I risultati in IFU sono stati calcolati automaticamente usando un (fitting) avvicinamento con il 4 PL (4 Parameter Logistics). Altre funzioni usate per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

In seguito è riportato un esempio di una curva standard con DRG Hepcidin Prohormone ELISA.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	1,85
Standard 1 (10 ng/mL)	1,72
Standard 2 (50 ng/mL)	1,38
Standard 3 (100 ng/mL)	1,16
Standard 4 (250 ng/mL)	0,82
Standard 5 (500 ng/mL)	0,63
Standard 6 (1000 ng/mL)	0,48

7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DRG Hepcidin Prohormone ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

Popolazione	N Valori	5% - 95 % Percentile	media	“median”
uomini e donne	80	58,9 – 158,1	104,5	92,2

8 CARATTERISTICHE DEL TEST

8.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0 – 1000 ng/mL.

8.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

8.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi meno due deviazioni standard di 21 repliche dello *Standard 0* ed erano < 3,95 ng/mL.

8.4 Precisione

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

8.5 Esattezza

8.5.1 Controllo qualità

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DRG.

8.5.2 Ritrovato

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

8.5.3 Linearità

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9 LIMITAZIONE DEL TEST

9.1 Sostanze interferenti

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare i risultati.

9.2 Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di proormone epcidina nel campione.

9.3 Effetto Hook di alti dosaggi

Nessun effetto gancio (effetto hook) è stato osservato in questo test.

10 ASPETTI LEGALI

10.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test. I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DRG.

10.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 10.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente. Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche. Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

10.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento. Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 10.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

11 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DRG Hepcidin Prohormone** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del Prohormona Hepcidina en suero.

Sólo para uso en investigación.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

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

Las placas multipocillo están recubiertas de anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra el anticuerpo anti-Hepcidina-(28-47 aa). Una cantidad desconocida de Prohepcidina presente en la muestra y una cantidad fija de Hepcidina conjugada con biotina compiten por los sitios de unión de los anticuerpos Prohepcidina inmovilizados en los pocillos. Después de la incubación el conjugado no unido se lava.

La cantidad de conjugado unido es inversamente proporcional a la concentración de Prohormona Hepcidina en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Prohormona Hepcidina en la muestra del paciente.

3 PRECAUCIONES

- Sólo para uso en investigación.
- 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 H_2SO_4 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. Las hojas de los datos de seguridad se ajustan a las demandas de la guía europea: EU-Guideline 91/155 EC.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (*Placas multipocillo*), 12x8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-Prohormona Hepcidina (policlonal).
2. **Standard (Standard 0-6)**, (Estándar), 7 viales (líoofilizados), 1 mL; Concentraciones: 10, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/mL (synthetic peptide Hepcidin (28-47)). Ver "Preparación de los Reactivos"; contiene < 0,02% Metilisotiazolona (MIT) y 0,02% Bromonitrodioxano (BND) como conservante.
3. **Control**, 1 vial (líoofilizado), 1 mL, ver "Preparación de los Reactivos" Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC. Contiene < 0,02% Metilisotiazolona (MIT) y 0,02% Bromonitrodioxano (BND) como conservante.
4. **Assay Buffer** (*Tampón de ensayo*), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Contiene < 0,02% Metilisotiazolona (MIT) y 0,02% Bromonitrodioxano (BND) como conservante.
5. **Biotin Conjugate** (*Conjugado Biotina*), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Fragmento Prohepcidina conjugado con biotina; Contiene < 0,02% Metilisotiazolona (MIT) y 0,02% Bromonitrodioxano (BND) como conservante.
6. **Enzyme Complex** (*Complex enzimático*), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene peroxidasi di rafano. Contiene < 0,02% Metilisotiazolona (MIT) y 0,02% Bromonitrodioxano (BND) como conservante.
7. **Substrate Solution** (*Solución de sustrato*), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
8. **Stop Solution** (*Solución de parada*), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.5M H₂SO₄, Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en al piel.
9. **Wash Solution** (*Solución de lavado*), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver "Preparación de los Reactivos".

4.1.1 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.

4.2 Almacenamiento y estabilidad del kit

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

Los kits abiertos conservan su actividad durante dos meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.3 Preparación de los Reactivos

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

Standards

Reconstituir los contenidos líoofilizados de los viales de los estándares con 1,0 mL de agua destilada.

Nota: Los estándares reconstituidos son estables durante 6 días a 2-8°C. Para períodos más largos congelar a -20°C.

Control

Reconstituir el contenido líoofilizado con 1,0 mL de agua destilada y dejar reposar como mínimo durante 10 minutos. Mezclar el control varias veces antes de usar.

Nota: El control reconstituido es estable durante 6 días a 2-8°C. Para períodos más largos congelar a -20°C.

Wash Solution

Mezclar 30 mL de la solución de lavado 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.

4.4 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).

4.5 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

En este ensayo pueden usarse suero.

No usar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas.

Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Toma de muestras**Suero:**

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación (2500 x g, 10 min. a 4°C).

Para otros tipos de materiales es necesario un protocolo especial de extracción.

5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 24 horas a 2-8°C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo han de congelarse sólo una vez a -20°C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

Tener en cuenta: Las muestras de pacientes que han estado congeladas durante períodos más largos o que han sido descongeladas varias veces, muestran concentraciones más elevadas de Hepcidina que las muestras frescas que sólo han sido congeladas una vez.

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 *Assay Buffer* 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 Suero + 90 µL *Assay Buffer* (mezclar totalmente)
b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Assay Buffer* (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 *Assay Buffer* a cada pocillo.
3. Dispensar **50 µL** de cada *Standard*, *Control* y muestras con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
4. Dispensar **100 µL** de *Biotin Conjugate* a cada pocillo.
5. Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
6. Incubar durante **120 minutos** a temperatura ambiente (sin cubrir la placa).
7. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos 5 veces con solución de lavado diluida (400 µL por pocillo). 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!

8. Adicionar **100 µL** de *Enzyme Complex* a cada pocillo.
9. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente.
10. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos 5 veces con solución de lavado diluida (400 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
11. Adicionar **100 µL** de *Substrate Solution* a cada pocillo.
12. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
13. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de *Stop Solution* a cada pocillo.
14. 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 la IFU se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 PL (4 Parámetros Logísticos). Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de la muestra 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.

Abajo aparece un ejemplo típico de una curva estándar con el DRG Hepcidin Prohormone ELISA.

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	1,85
Standard 1 (10 ng/mL)	1,72
Standard 2 (50 ng/mL)	1,38
Standard 3 (100 ng/mL)	1,16
Standard 4 (250 ng/mL)	0,82
Standard 5 (500 ng/mL)	0,63
Standard 6 (1000 ng/mL)	0,48

7 VALORES ESPERADOS

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

En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DRG Hepcidin Prohormone ELISA se observaron los siguientes valores:

Población	N válido	Percentil 5% - 95 %	valor medio	numero medio (Median)
hombres y mujeres	80	58,9 – 158,1	104,5	92,2

8 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

8.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0 – 1000 ng/mL.

8.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

8.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media menos dos desviaciones estándar de 21 réplicas del *Estándar 0* y resultó ser < 3,95 ng/mL.

8.4 Precisión

Consultar el manual de usuario en inglés.

8.5 Exactitud

8.5.1 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. Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud 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 mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DRG directamente.

8.5.2 Recuperación

Consultar el manual de usuario en inglés.

8.5.3 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

9 LIMITACIONES DE USO

9.1 Sustancias que pueden interferir

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

9.2 Interferencias con drogas

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

9.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo.

10 ASPECTOS LEGALES

10.1 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.

10.2 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 10.1. 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

10.3 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 10.2 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.

11 REFERENCIAS

Consultar el manual de usuario en inglés.

1 INTRODUCTION

Le kit de dosage immuno-enzymatique **DRG Hepcidin Prohormone ELISA** propose les matériaux requis pour la mesure quantitative de pro-hepcidine dans le sérum.

Seulement dans le cadre de recherches.

2 PRINCIPE DU TEST

Le kit DRG Hepcidin Prohormone ELISA est basé sur une réaction immuno-enzymatique compétitive. Les plaques de microtitration sont recouvertes d'un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'anticorps anti-hepcidine (28-47 aa). Une quantité inconnue de pro-hepcidine contenue dans l'échantillon et une quantité fixe d'hepcidine conjuguée à la molécule de biotine entrent en compétition avec les anticorps anti-pro-hepcidine immobilisés dans les puits.

Après incubation, le conjugué non-lié est éliminé durant le lavage des puits.

La quantité de peroxidase liée est inversement proportionnelle à la concentration de pro-hepcidine contenue dans l'échantillon. Suite à l'addition de solution substrat, l'intensité de coloration obtenue est inversement proportionnelle à la concentration de pro-hepcidine contenue dans l'échantillon.

3 PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Seulement dans le cadre de recherches.
- Les informations concernant la toxicité des réactifs contenus dans ce kit sont présentées dans la fiche de sécurité (« Material Safety Data Sheets »).
- Tous les réactifs de ce kit contenant du sérum ou du plasma humain ont été testés avec des résultats négatifs pour le VIH I/II, le HBsAg et le HCV selon les normes FDA en vigueur. Néanmoins, lors de leur utilisation, tous les réactifs de ce kit doivent être manipulés avec précaution.
- Eviter les contacts avec la *Stop Solution*, celle-ci contient 0.5 M de H₂SO₄. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
- Ne jamais pipeter avec la bouche, et éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec les réactifs ou les échantillons.
- Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où les échantillons ou le kit ont été maniés.
- Porter des gants d'examen lors de l'utilisation des échantillons ou des réactifs. Une contamination microbienne des échantillons ou des réactifs pourrait fausser les résultats.
- L'utilisation de ce kit devra être en accord avec les normes ou recommandations nationales de sécurité en vigueur concernant les produits à risque biologique.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration inscrite sur l'emballage.
- Tous les volumes indiqués doivent être scrupuleusement respectés, comme indiqué dans le protocole expérimental. Seule l'utilisation de pipettes calibrées ou d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques calibré garantit l'obtention de résultats optimaux à ce test.
- Ne pas mélanger ou utiliser des réactifs contenus dans des kits de lots différents. Il est conseillé de ne pas échanger les puits de différentes plaques, même si celles-ci proviennent du même lot. Les kits peuvent avoir été transportés ou stockés différemment, et les caractéristiques de liaison de chaque plaque pourraient ainsi être modifiées.
- L'élimination des solutions chimiques et des réactifs contenus dans ce kit, utilisés ou non, doit être en accord avec la réglementation nationale en vigueur concernant l'élimination des déchets à risque biologique.
- La fiche de sécurité concernant ce produit peut être obtenue en contactant directement DRG Instruments GmbH. Les fiches de sécurité sont en accord avec les directives européennes EU 91/155 EC.

4 COMPOSITION DU KIT

4.1 Contenu du kit

1. **Microtiterwells** (*Plaques de micro-titratio*), 12x8 (à détacher) barrettes, plaques de 96 puits; Les puits sont recouverts avec un anticorps anti-pro-hepcidine (polyclonal).
2. **Standard (Standard 0-6)**, 7 flacons (lyophilisés), 1 mL; Concentrations: 10, 50, 100, 250, 500, 1000 ng/mL (synthetic peptide Hepcidin (28-47)). Voir « Préparation des réactifs » ; contient < 0,02% Méthylisothiazolone (MIT) e < 0,02% Bromonitrodioxane (BND) comme agent de conservation.
3. **Control (Contrôle)**, 1 flacon (lyophilisé), 1 mL, voir « Préparation des réactifs » Les valeurs contrôles et limites sont indiquées sur l'étiquette du flacon ou sur la fiche QC. Contient < 0,02% Méthylisothiazolone (MIT) e < 0,02% Bromonitrodioxane (BND) comme agent de conservation.
4. **Assay Buffer** (*Tampon d'essai*), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi, contient < 0,02% Méthylisothiazolone (MIT) e < 0,02% Bromonitrodioxane (BND) comme agent de conservation.
5. **Biotin Conjugate** (*Conjugué biotine*), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi, fragment de pro-hepcidine conjugué à la biotine contient < 0,02% Méthylisothiazolone (MIT) e < 0,02% Bromonitrodioxane (BND) comme agent de conservation.
6. **Enzyme Complex** (*Complexe enzymatique*), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi. contient HRP, contient < 0,02% Méthylisothiazolone (MIT) e < 0,02% Bromonitrodioxane (BND) comme agent de conservation.
7. **Substrate Solution** (*Solution substrat*), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi, Tétraméthylbenzidine (TMB).
8. **Stop Solution** (*Solution d'arrêt*), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi, contient 0.5M de H₂SO₄, Eviter les contacts avec la solution stop. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
9. **Wash Solution** (*Solution de lavage*), 1 flacon (concentré 40X), voir « Préparation des réactifs ».

4.1.1 Equipement et matériel requis, mais non fournis

- Un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques calibré (450±10 nm) (ex. le lecteur de microplaques de DRG Instruments GmbH).
- Des micro-pipettes de précision variables et calibrées.
- Du papier absorbant.
- De l'eau distillée.

4.2 Stockage et stabilité du kit

Les réactifs contenus dans des flacons non-ouverts, stockés à 2-8°C, seront stables jusqu'à la date d'expiration inscrite sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au delà de cette date.

Les réactifs contenus dans des flacons ouverts doivent être stockés à 2-8°C. Les micro-plaques doivent être stockées à 2-8°C. Une fois la capsule d'aluminium ouverte, attention à bien refermer le flacon.

Les kits ouverts conservent leur activité durant deux mois s'ils sont stockés comme précédemment mentionné.

4.3 Préparation des réactifs

Amener tous les réactifs et le nombre de barrettes nécessaires au test à température ambiante avant utilisation.

Standards

Reconstituer le contenu lyophilisé des flacons de standards avec 1,0 mL d'eau distillée.

Remarque : Les standards reconstitués sont stables 6 jours à 2-8°C.

Pour un stockage prolongé, congeler à -20°C.

Control

Reconstituer le contenu lyophilisé avec 1,0 mL d'eau distillée et laisser incuber au minimum 10 minutes.

Mélanger le contrôle plusieurs fois avant utilisation.

Remarque : Le contrôle reconstitué est stable 6 jours à 2-8°C.

Pour un stockage prolongé, congeler à -20°C.

Wash Solution

Diluer 30 mL de solution de lavage concentrée avec 1170 mL d'eau désionisée, pour un volume final de 1200 mL.

Remarque : La solution de lavage diluée est stable deux semaines à température ambiante.

4.4 Elimination des déchets relatifs au kit

L'élimination des déchets relatifs au kit doit être réalisée selon les règles nationales en vigueur. Les informations spécifiques au kit sont présentées dans la fiche de sécurité (voir chapitre 13).

4.5 Kits endommagés

Dans le cas de dommages importants survenus au kit ou ses composants, informer la DRG, au plus tard une semaine après réception du kit. Les composants endommagés ne doivent pas être utilisés pour le test. Ils doivent être stockés jusqu'à ce qu'une solution adaptée ait été trouvée. Après cela, ils doivent être éliminés selon les directives officielles en vigueur.

5 ECHANTILLON

Sérum peuvent être utilisés pour ce test.

Ne pas utiliser des échantillons hémolysés, ictériques ou lipémiques.

Remarque : Les échantillons contenant de l'azide de sodium ne doivent pas être utilisés pour ce test.

5.1 Prélèvement et préparation des échantillons

Sérum:

Prélever le sang par ponction veineuse (ex. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), laisser coaguler, puis séparer le sérum par centrifugation (2500 x g, 10 min. à 4°C). Ne pas centrifuger avant que la coagulation ne soit terminée. Pour d'autres types d'échantillons, un protocole d'extraction particulier peut être nécessaire.

5.2 Conservation des échantillons

Les tubes contenant les échantillons doivent être fermés et peuvent être stockés jusqu'à 24 heures à 2-8°C avant d'être testés.

Les échantillons stockés pour un temps prolongé doivent être congelés à -20°C avant d'être testés. Les échantillons décongelés doivent être retournés plusieurs fois avant le test.

Remarque : les échantillons de patients qui ont été congelés durant une longue période ou qui ont été décongelés de façon répétée présentent de plus fortes concentrations en hepcidine que des échantillons ayant été congelés une seule fois.

5.3 Dilution de l'échantillon

Si, lors d'un test préliminaire, la concentration de l'échantillon se révèle être supérieure à celle du standard le plus concentré, alors l'échantillon doit être dilué avec le Assay Buffer et testé de nouveau, comme décrit dans Réalisation du test.

Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

Exemple:

a) dilution 1:10: 10 µL Sérum + 90 µL Assay Buffer (bien mélanger).

b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL Assay Buffer (bien mélanger).

6 RÉALISATION DU TEST

6.1 Remarques générales

- Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante avant utilisation. Tous les réactifs doivent être mélangés, sans formation de mousse.
- Une fois la procédure engagée, toutes les étapes doivent être réalisées sans interruption.
- Utiliser un nouveau cône de pipette pour chaque standard, contrôle ou échantillon, ceci afin d'éviter toute contamination.
- L'absorbance est fonction du temps d'incubation et de la température. Avant de commencer le test, il est recommandé de préparer tous les réactifs, bouchons ouverts, de préparer les puits des microplaques, etc. Cela garantira un intervalle de temps équivalent entre chaque étape, sans interruption.
- En règle générale, la réaction enzymatique est linéairement proportionnelle au temps et à la température.

6.2 Réalisation du dosage

Chaque test doit inclure une courbe étalon.

1. Disposer le nombre de puits de micro-titration désiré dans le support.
2. Déposer **100 µL** d' *Assay Buffer* dans chaque puits.
3. Déposer **50 µL** de chaque *Standard*, *Control* et les échantillons, avec de nouveaux cônes de pipette, dans les puits appropriés.
4. Déposer **100 µL** *Biotin Conjugate* dans chaque puits.
5. Bien mélanger pendant 10 secondes. Il est important d'obtenir un mélange parfait lors de cette étape.
6. Incuber pendant **120 minutes** à température ambiante (sans couvrir la plaque).
7. Décanter le contenu des puits et rincer les puits 5 fois avec de la solution de lavage diluée (400 µL par puits). Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
Remarque importante:
La sensibilité et la précision de ce test sont fortement dépendantes de la bonne réalisation des étapes de lavage !
8. Ajouter **100 µL** d' *Enzyme Complex* à chaque puits.
9. Incuber pendant **60 minutes** à température ambiante.
10. Décanter le contenu des puits et rincer les puits 5 fois avec de la solution de lavage diluée (400 µL par puits). Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
11. Ajouter **100 µL** de *Substrate Solution* à chaque puits.
12. Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante.
13. Stopper la réaction enzymatique en ajoutant **100 µL** de *Stop Solution* à chaque puits.
14. Lire la densité optique à **450±10 nm** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques **dans les 10 minutes** après avoir ajouté la *Stop Solution*.

6.3 Calcul des résultats

1. Calculer les valeurs moyennes des densités optiques pour chaque série de standards, contrôles et échantillons.
2. Etablir la courbe étalon en reportant la densité optique moyenne de chaque valeur standard en fonction de sa concentration, en posant la densité optique en axe des ordonnées et la concentration en axe des abscisses.
3. L'utilisation de la densité optique moyenne pour chaque échantillon détermine la concentration correspondante à partir de la courbe étalon.
4. Méthode automatique. Les résultats dans le IFU ont été calculés de façon automatique en utilisant une courbe de régression 4 PL (4 Parameter Logistics). D'autres fonctions logistiques peuvent donner des résultats légèrement différents.
5. La concentration des échantillons peut être lue directement à partir de cette courbe étalon. Les échantillons avec une concentration supérieure à celle du plus haut standard doivent être dilués de nouveau. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

Ci-dessous est représenté un exemple typique de courbe étalon réalisée avec le DRG Hepcidin Prohormone ELISA.

Standard	Unités optiques (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	1,85
Standard 1 (10 ng/mL)	1,72
Standard 2 (50 ng/mL)	1,38
Standard 3 (100 ng/mL)	1,16
Standard 4 (250 ng/mL)	0,82
Standard 5 (500 ng/mL)	0,63
Standard 6 (1000 ng/mL)	0,48

7 VALEURS ATTENDUES

Il est fortement recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs normales ou anormales.

Dans une étude réalisée avec des adultes normaux et sains, à l'aide du kit DRG Hepcidin Prohormone ELISA, les valeurs suivantes sont observées :

Population	Valid N	5% - 95 % Pourcentage	valeur moyenne	médiane (Median)
hommes et femmes	80	58,9 – 158,1	104,5	92,2

8 CARACTERISTIQUES DU TEST

8.1 Zone de mesure

Les limites du dosage sont comprises entre 0 – 1000 ng/mL.

8.2 Spécificité des anticorps (Réaction croisée)

Voir le manuel d'utilisateur en version anglaise.

8.3 Sensibilité de l'analyse

La sensibilité de l'analyse a été calculée à partir de la moyenne la plus faible de deux déviations standards de l'analyse de 21 réplicats du *Standard 0* et a été mesurée à < 3,95 ng/mL.

8.4 Précision

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

8.5 Exactitude

8.5.1 Contrôle de qualité

Il est recommandé d'utiliser les échantillons contrôles selon les réglementations nationales en vigueur. L'utilisation des échantillons contrôles est recommandée afin de s'assurer jour après jour de la validité des résultats. Utiliser les contrôles de valeurs normales et pathologiques.

Les contrôles et les résultats correspondants issus du laboratoire QC sont mentionnés dans le certificat QC fourni avec le kit. Les valeurs et les limites mentionnées sur la fiche QC font toujours référence au lot de kit courant et doivent être utilisées pour une comparaison directe avec les résultats.

Il est également recommandé d'utiliser les programmes d'évaluation de qualité nationaux ou internationaux, afin de s'assurer de l'exactitude des résultats.

Utiliser les méthodes d'analyses statistiques appropriées pour l'analyse des valeurs contrôles et des tendances. Si les résultats ne correspondent pas aux limites établies des contrôles, les résultats concernant ces patients doivent être considérés comme non valides.

Dans ce cas, tester les zones techniques suivantes : mécanisme de pipetage et temps; spectrophotomètre, dates d'expiration des réactifs, conditions de stockage et d'incubation, méthodes d'aspiration et de lavage.

Après avoir testé les points mentionnés, si aucune erreur n'est détectée, contacter votre distributeur ou directement la DRG.

8.5.2 Recouvrement

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

8.5.3 Linéarité

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

9 LIMITES D'UTILISATION

9.1 Substances parasites

Toute utilisation impropre des échantillons ou toute modification du test peut influencer les résultats.

9.2 Drogues parasites

Jusqu'à présent, nous ne connaissons aucune substance (drogues) capable d'influencer la mesure de pro-hepcidine dans un échantillon.

9.3 Effet de surdosage

Aucun effet de surdose n'a été observé avec ce test.

10 ASPECTS LEGAUX

10.1 Fiabilité des résultats

Ce test doit être exactement utilisé selon les instructions d'utilisation du fabricant. De plus, les utilisateurs doivent strictement respecter les règles de la bonne pratique de laboratoire, ou autres lois nationales. Cela est spécialement le cas pour l'utilisation des réactifs contrôles. Pour chaque test, il est important d'inclure un nombre suffisant de contrôles, afin de pouvoir valider l'exactitude et la précision du test.

Les résultats du test sont valides si et seulement si tous les contrôles sont compris dans les gammes de mesure mentionnées et si tous les autres paramètres du test sont également compris dans les instructions de ce test. En cas de doute ou d'inquiétude, contacter la DRG.

10.2 Conséquences thérapeutiques

Les suites thérapeutiques ne devront jamais être basées sur les résultats de laboratoire seuls, même si les tous les résultats du test sont en accord avec les points mentionnés dans le paragraphe 10.1. Tout résultat n'est qu'une partie du tableau clinique complet d'un patient.

Les suites thérapeutiques peuvent découler des résultats de laboratoire si et seulement si ceux-ci sont en accord avec l'ensemble du tableau clinique du patient.

Le résultat du test en lui-même ne doit en aucun cas être le seul déterminant des suites thérapeutiques à suivre.

10.3 Responsabilité

Toute modification du kit et / ou échange ou mélange d'un des composants de différents lots, d'un kit à un autre, pourrait affecter de façon négative les résultats attendus et la validité du test dans son ensemble. De telles modifications ou échanges invalident toute réclamation pour remplacement.

Toutes les réclamations soumises, relatives au paragraphe 10.2, et dues à une mauvaise interprétation des résultats de laboratoire de la part du client sont également invalides. Néanmoins, en cas de réclamation, la responsabilité du fabricant n'est pas de dépasser les limites de la valeur du kit. Tout dommage causé au kit lors de son transport n'est pas du ressort de la responsabilité du fabricant.

11 REFERENCES

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

SYMBOLS USED WITH DRG ELISA'S

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consultez le Mode d'emploi	Consulte las Instrucciones	Consulti le istruzioni
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostica in vitro
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de micro-titration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Estándar 0	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante

Symbol	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
FRO				
	Conformidade com as normas europeias	Europæisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Instruções de uso	Brugermanual	Användar manual	Εγχειρίδιο χρήστη
IVD	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	Diagnostik in vitro	in vitro διαγνωστικό
REF	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalog nummer	Αριθμός καταλόγου
LOT	No do lote	Lot nummer	Batch-nummer	Αριθμός Παρτίδος
		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Opbevaringstemperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Prazo de validade	Udløbsdato	Bäst före datum	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Producent	Tillverkare	Κατασκευαστής
<i>Distributed by</i>				
<i>Content</i>	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο
<i>Volume/No.</i>	Volume/Número	Volumen/antal	Volym/antal	Όγκος/αριθ..
<i>Microtiterwells</i>	Alvéolos de microtitulação	Mikrotiterbrønde	Brunnar i Mikrotiterplatta	Πηγαδάκια Μικροπιλοδοτήσεως
<i>Antiserum</i>	Anti-soro	Antiserum	Antiserum	Αντιορός
<i>Enzyme Conjugate</i>	Conjugado enzimático	Enzymkonjugat	Enzymkonjugat	Συζευγμένο ένζυμο
<i>Enzyme Complex</i>	Complexo enzimático	Enzymkompleks	Enzymkomplex	Σύμπλοκο ενζύμου
<i>Substrate Solution</i>	Solução de substrato	Substratopløsning	Substratlösning	Διάλυμα υποστρώματος
<i>Stop Solution</i>	Solução de paragem	Stopopløsning	Stopp lösning	Διάλυμα τερματισμού
<i>Zero Standard</i>	Padrão zero	Standard 0	Standard 0	Πρότυπο Μηδέν
<i>Standard</i>	Calibrador	Standard	Standard	Πρότυπα
<i>Control</i>	Controlo	Kontrol	Kontroll	Έλεγχος
<i>Assay Buffer</i>	Tampão de teste	Assay buffer	Assay Buffer	Ρυθμιστικό Διάλυμα Εξέτασης
<i>Wash Solution</i>	Solução de lavagem	Vaskebuffer	Tvätt lösning	Διάλυμα πλύσεως
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl
<i>Sample Diluent</i>				
<i>Conjugate Diluent</i>				