

# Quantikine® IVD® ELISA

## Inserto aggiuntivo dell'EPO Umana ELISA Kit

Codice catalogo DEP00

Questo inserto supplementare contiene il protocollo di dosaggio ed esecuzione e deve essere letto interamente prima di utilizzare il prodotto. Per le referenze e caratteristiche, come per i protocolli in Inglese, per favore fare riferimento al protocollo principale.



**IVD** PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

 **FABBRICATO E DISTRIBUITO PER:**

**USA & Canada | R&D Systems, Inc.**

614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA

TEL: (612) 379-2956 FAX: (612) 656-4400

E-MAIL: [info@RnDSystems.com](mailto:info@RnDSystems.com)

**EC** **REP** **DISTRIBUITO PER:**

**UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd.**

19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UK

TEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420

E-MAIL: [info@RnDSystems.co.uk](mailto:info@RnDSystems.co.uk)

# SOMMARIO

## INDICE

## PAGINA

|   |    |
|---|----|
| REAGENTI FORNITI.....                                       | 2  |
| CONSERVAZIONE.....  | 2  |
| PRECAUZIONI E AVVISI.....                                   | 3  |
| INDICAZIONI DI INSTABILITÀ O DETERIORAMENTO .....           | 3  |
| ALTRO MATERIALE RICHIESTO .....                             | 4  |
| STRUMENTI .....   | 4  |
| LIMITAZIONI.....  | 4  |
| RACCOLTA CAMPIONI E CONSERVAZIONE .....                     | 5  |
| PREPARAZIONE REAGENTI.....                                  | 5  |
| PROCEDURA DEL DOSAGGIO.....                                 | 6  |
| SCHEMA DELLA PIASTRA .....                                  | 7  |
| CALCOLO DEI RISULTATI .....                                 | 8  |
| RISULTATI TIPO.....   | 8  |
| DILUZIONE DEI CAMPIONI CON ALTA CONCENTRAZIONE DI EPO ..... | 9  |
| CONTROLLO QUALITÀ .....                                     | 9  |
| GUIDA ALLA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI .....                   | 10 |
| VALORI ATTESI .....   | 11 |

### MODO D'USO

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) per la determinazione quantitativa della concentrazione di Eritropoietina nel siero e plasma umano e per la diagnosi di anemie e policitemie.




### PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il Quantikine IVD Epo ELISA è basato sul metodo del doppio anticorpo a sandwich. I pozzetti della micropiastra hanno l'anticorpo monoclonale (murino) specifico per l'Eritropoietina (Epo) già adeso sul fondo dove vengono incubati i campioni o lo standard. Epo si lega all'anticorpo adeso nella micropiastra. Dopo aver rimosso l'eccesso del campione o dello standard, nei pozzetti viene incubato l'anti Epo policlonale (di coniglio) coniugato con l'enzima horseradish peroxidase. Durante la seconda incubazione l'anticorpo coniugato con l'enzima si lega alla Epo immobilizzata. L'eccesso del coniugato si rimuove con il lavaggio. Un cromogeno viene aggiunto nei pozzetti e tramite la reazione d'ossidazione con l'enzima forma un complesso di colore blue. La reazione viene fermata con l'aggiunta di acido che fa cambiare il colore da blue a giallo. L'ammontare di colore generato è direttamente proporzionale all'ammontare di coniugato che si è legato con il complesso anticorpale di Epo, che a sua volta è direttamente proporzionale all'ammontare di Epo nel campione o nello standard. L'assorbanza del complesso viene misurata e una curva standard è generata dalla comparazione tra l'assorbanza e la concentrazione dello standard di Epo. La concentrazione di Epo nel campione viene determinata comparando la densità ottica del campione con la curva standard. Gli standard utilizzati in questo dosaggio sono Epo ricombinante umana calibrata con il Second International Reference Preparation (67/343), una forma della eritropoietina umana di derivazione urinaria.

## REAGENTI FORNITI

|   |   |   |  |
|---|---|---|--|
| SORB  | <b>Eritropoietina Micropiastra</b> (Part 890126) - Micropiastra da 96 pozzetti in polistirene (12 strisce da 8 pozzetti) con adeso l'anticorpo murino monoclonale contro la Epo umana ricombinante. |   |  |
| CONJ  | <b>Eritropoietina Coniugato</b> (Part 890127) - 21,5 mL di anticorpo policlonale di coniglio contro la Epo umana ricombinante coniugato con l'horseradish peroxidase con conservante.               |   |  |
| CAL   | 0   | <b>Eritropoietina 0.0 mIU/mL Standard</b> (Part 890128) - 2,1 mL di proteina base tamponata con conservante.  |  |
| CAL   | 2.5   | <b>Eritropoietina 2.5 mIU/mL Standard</b> (Part 890129) - 2,1 mL di Epo ricombinante umana in proteina base tamponata con conservante.                          |  |
| CAL   | 5   | <b>Eritropoietina 5.0 mIU/mL Standard</b> (Part 890130) - 2,1 mL di Epo ricombinante umana in proteina base tamponata con conservante.                          |  |
| CAL   | 20  | <b>Eritropoietina 20.0 mIU/mL Standard</b> (Part 890131) - 2,1 mL di Epo ricombinante umana in proteina base tamponata con conservante.                         |  |
| CAL   | 50  | <b>Eritropoietina 50.0 mIU/mL Standard</b> (Part 890132) - 2,1 mL di Epo ricombinante umana in proteina base tamponata con conservante.                         |  |
| CAL   | 100   | <b>Eritropoietina 100.0 mIU/mL Standard</b> (Part 890133) - 2,1 mL di Epo ricombinante umana in proteina base tamponata con conservante.                        |  |
| CAL   | 200   | <b>Eritropoietina 200.0 mIU/mL Standard</b> (Part 890134) - 2,1 mL di Epo ricombinante umana in proteina base tamponata con conservante.                        |  |
| DIL   | AS  | <b>Eritropoietina Diluente di Dosaggio</b> (Part 895057) - 11 mL of di proteina base con tampone con conservante: Contiene sodio azotato                        |  |
| DIL   | SPE   | <b>Diluente del Campione</b> (Part 895058) - 26 mL di proteina stabilizzata in tampone con conservante.   |  |
| BUF   | WASH  | 25X   | <b>Erythropoietina Tampone di Lavaggio Concentrato</b> (Part 895059) - 100 mL in 25 X concentrato con conservante. |
| SUBS  | A   | <b>Reagente Colore A</b> (Part 895549) - 12 mL di Reagente Colore A (0,01 N perossido d'idrogeno tamponato).  |  |
| SUBS  | B   | <b>Reagente Colore B</b> (Part 895550) - 12 mL di Reagente Colore B (0,35 g/L tetrametilbenzidina).   |  |
| SOLN  | STOP  | <b>Soluzione Stop</b> (Part 895060) - 11 mL of 2 N acido solforico. Attenzione : materiale caustico. Indossare la protezione per occhi, mani, faccia e vestiti. |  |
| <b>Coperchio della piastra</b> - 4 strisce adesive. |   |   |  |

## CONSERVAZIONE

|                               |   |   |   |
|-------------------------------|---|---|---|
| <b>Kit integro</b>            | <b>Conservarlo a 2-8° C. Non usare dopo la data di scadenza.</b>  |   |  |
| Reagenti aperti e già diluiti | Tampone di Lavaggio diluito   | può essere conservato a temperatura ambiente (20-25° C) fino alla scadenza del kit. |  |
|                               | Soluzione Stop  | Conservare a 2-8° C fino alla scadenza del kit.                                     |  |
|                               | Diluente dei Campioni   |   |   |
|                               | Diluente del Dosaggio   |   |   |
|                               | Coniugato   |   |   |
|                               | Reagente Colore A, non mischiato  |   |   |
|                               | Reagente Colore B, non mischiato  |   |   |
|                               | Standard (0,0-200 mIU/mL)   |   |   |
| Micropiastra e Pozzetti       | Riporre i pozzetti non utilizzati nel contenitore color alluminio con la bustina essiccatrice e richiuderlo. Conservarlo a 2-8° C fino alla scadenza del kit. |   |   |

## PRECAUZIONI E AVVISI

### Per uso diagnostico in vitro

- Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.
- Per risultati ottimali ogni laboratorio deve validare un metodo specifico (con o senza agitatore) e usare lo stesso metodo per tutti i dosaggi.
- Per ridurre le variazioni interne di dosaggio, si raccomanda di effettuare i caricamenti entro 15 minuti.
- Non sostituire i reagenti del kit con reagenti di lotti o fonti diverse.
- Non esporre i reagenti a fonti luminose intense durante la conservazione e le incubazioni.
- Evitare il contatto dei reagenti con agenti ossidanti e metalli.
- L'esposizione al sodio azotato inattiva il coniugato.
- Non pipettare con la bocca.
- Non fumare o mangiare nelle aree dove i reagenti del kit o i campioni sono maneggiati.
- Evitare il contatto della pelle e delle mucose con i reagenti del kit e con i campioni.
- Se la soluzione del reagente colore o la soluzione stop (2 N acido solforico) entrano in contatto con gli occhi o la pelle, lavare con acqua abbondante e contattare aiuto medico.
- Maneggiare tutti i sieri e i materiali in contatto con i sieri seguendo le linee guida del CLSI per prevenire la trasmissione di patogeni portati in sangue durante le procedure di laboratorio.
- Tempi di incubazione diversi da quelli specificati possono causare risultati errati.
- La contaminazione dei reagenti del kit può causare dei risultati errati.
- Se possibile utilizzare materiale monouso per le pipette, i puntali e per i contenitori utilizzati per la preparazione e stoccaggio dei reagenti. La vetreria utilizzata deve essere risciacquata con 1N di acido solforico o 1 N di acido idrocloridrico seguito da almeno tre lavaggi con acqua deionizzata. Nessun acido o detergente deve rimanere nella vetreria.
- Utilizzare provette di polipropilene o polietilene ad alta densità (HDPE) per la diluizione dei campioni. **NON UTILIZZARE CONTENITORI IN VETRO.**
- Alcuni componenti del kit contengono sodio azotato che può reagire con il piombo e il rame dell'impianto conduttivo di scarico e formare composti metallici azotati esplosivi. Usare acqua abbondante durante lo scarico.

## INDICAZIONI DI INSTABILITÀ O DETERIORAMENTO

La soluzione substrato deve essere non-colorata quando separata o combinata. I precipitati nelle soluzioni dei reagenti sono generalmente considerati indicatori di instabilità o deterioramento. Se una di queste condizioni di deterioramento o instabilità è presente, o se la correlazione del coefficiente di curva standard è inferiore a 0,95, conservate i reagenti(e) a 2-8° C e contattate la R&D Systems Europe su +44 (0)1235 529449.

## ALTRO MATERIALE RICHIESTO

- Pipette e puntali.
- Agitatore orbitale orizzontale (0,12") per micropiastre in grado di mantenere una velocità di  $500 \pm 50$  rpm (richiesta per il protocollo di agitazione).
- Cilindri graduati da 100 mL e da 4 litri.
- Pipetta multi-canale, spruzzatore, dispensatore multiplo o lavatore automatico di micropiastre.
- Carta o cuscinetto assorbente per i pozzetti.
- Lettore di micropiastre in grado di misurare una assorbanza di 450 nm, con filtro di correzione a 600 nm.
- Supporto per i reagenti.
- Acqua distillata o deionizzata.
- Software in grado di ottenere curve a 4 parametri per una miglior gestione dei dati.
- Controlli/o sierici di eritropoietina, ad esempio Quantikine IVD sierici umani di Controllo 1 e 2 e Controllo 3 (disponibili c/o R&D Systems con cat. Nr. CEP01 e CEP03 rispettivamente) o equivalenti.

## STRUMENTI

I risultati del dosaggio sono quantificati spettrofotometricamente a 450nm usando un lettore di micropiastre. Per ottenere risultati migliori, deve essere inserita una lunghezza d'onda di riferimento a 600 nm (anche 540 nm, 570 nm e 650 nm sono consentiti) per correggere le imperfezioni ottiche nelle piastre di polistirene. Strumenti senza filtri di riferimento possono essere utilizzati, ma la precisione del dosaggio potrebbe diminuire. Un lettore di micropiastre con un range di densità ottica di 0-3 densità ottica (D.O.) e una accuratezza di  $\pm 0,005$  D.O. è raccomandato. Lettori con un range di densità ottica minore di 0-3 D.O. possono essere usati, ma il range del dosaggio sarà ridotto.

## LIMITAZIONI

- Il risultato di questo dosaggio deve essere usato insieme alle informazioni disponibili dalle valutazioni cliniche e con altre procedure diagnostiche.
- Non sono state effettuate prove di interferenza del dosaggio con farmaci.
- Se il campione genera un valore superiore allo standard più alto, diluirlo nel diluente per campioni e ripetere il dosaggio.
- Ogni variazione dell'operatore, della tecnica di pipettamento, della tecnica di lavaggio, dei tempi di incubazione o di temperatura e l'anzianità del kit possono causare variazioni nel legame.

## RACCOLTA CAMPIONI E CONSERVAZIONE

**Siero** - Usare un separatore di siero o un tubo coagulo e far coagulare a temperatura ambiente (20-25° C). Centrifugare a 760xg\* per 15 minuti a temperatura ambiente entro 30 minuti dalla raccolta per evitare l'emolisi. Aliquotare e stoccare in tubi sterili a 2-8° C per un utilizzo entro 7 giorni o a oltre -10° C per lunghi stoccaggi in freezer senza defrost. Evitare cicli di congelamento e scongelamento.

**Plasma** - Prelevare plasma usando EDTA come anticoagulante. Centrifugare il campione a 760xg\* per 15 minuti a temperatura ambiente entro 30 minuti dalla raccolta. Aliquotare e stoccare in tubi sterili a 2-8° C per un utilizzo entro 7 giorni o a oltre -10° C per lunghi stoccaggi in freezer senza defrost. **Evitare cicli di congelamento e scongelamento.**

E' raccomandato che ogni laboratorio standardizzi il dosaggio con uno dei due tipi di campioni.

Campioni contaminati e evidentemente emolizzati potrebbero dare risultati errati e non dovrebbero essere testati con questa procedura. Inoltre non sono state testate le interferenze dei farmaci con il dosaggio.

Riferirsi alle linee guida CLSI: *Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens* (CLSI Documento H18; la revisione corrente)

$$*g = (1,118 \times 10^{-5}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$$

## PREPARAZIONE REAGENTI

**Portare tutti i reagenti e i campioni a temperatura ambiente (20-25° C) prima dell'uso.**

**Tampone di Lavaggio (1X)** - se si formano dei cristalli nel concentrato, portare a temperatura ambiente e agitare delicatamente fino a che i cristalli si dissolvono. Diluire 100 mL di diluente di lavaggio concentrato in acqua deionizzata o distillata per preparare 2500 mL di tampone di lavaggio (1X).

**Soluzione Substrato** - I reagenti colori A e B devono essere mischiati in volumi uguali entro 15 minuti dall'uso. 200 µL di soluzione è richiesta per ogni pozzetto. Buttare il reagente preparato e non usato (secondo le norme locali per lo smaltimento dei rifiuti).

| PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE SUBSTRATO PER DIMENSIONE DEL DOSAGGIO |                          |                          |
|--|--------------------------|--------------------------|
| Totale nr. Pozzetti per dosaggio                                   | Volume Reagente Colore A | Volume Reagente Colore B |
| 96   | 11 mL                    | 11 mL                    |
| 48   | 6 mL                     | 6 mL                     |
| 32   | 4 mL                     | 4 mL                     |

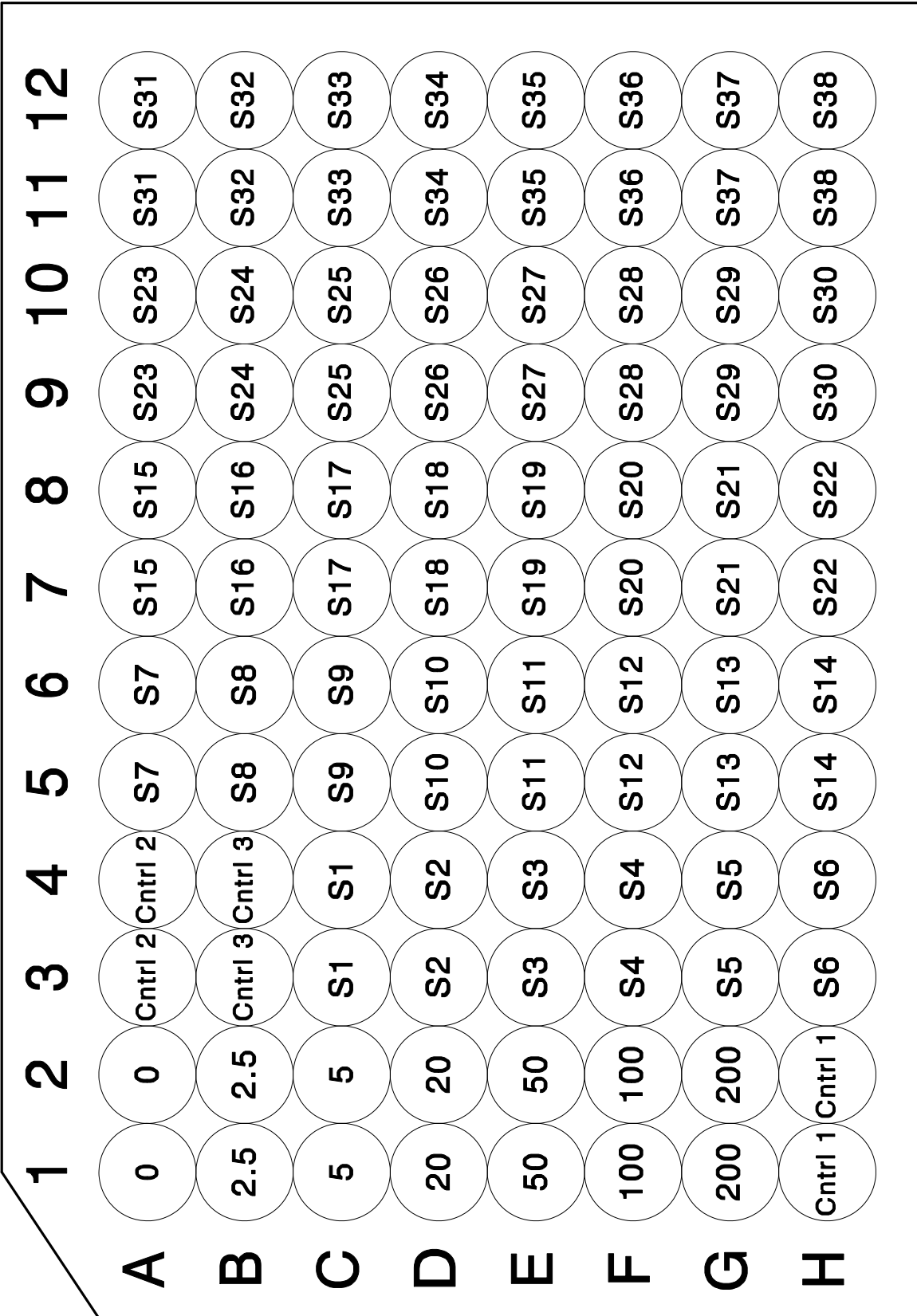
## PROCEDURA DEL DOSAGGIO

**Portare tutti i reagenti e i campioni a temperatura ambiente (20-25° C) prima dell'uso. Viene raccomandato di testare in doppio tutti i campioni, standard e controlli. I protocolli con e senza agitatore sono forniti. Lo stesso protocollo deve essere usato per tutto il dosaggio.**

1. Preparare i reagenti come descritto nella sessione precedente.
2. Rimuovere le strisce di micropiastre in eccesso e riporle nella busta color alluminio con dentro l'essiccante e risigillare.
3. Pipettare 100 µL Eritropoietina diluente di dosaggio in ogni pozzetto.
4. Aggiungere 100 µL di standard, controllo o campione per pozzetto. Scuotere molto delicatamente la micropiasta per circa 1 minuto per miscelare il contenuto dei pozzetti. Coprire la piastra con l'adesivo fornito. Uno schema contenente i diagrammi di esempio della piastra per gli standard, i controlli e i campioni è a pagina 68.  
**Per il protocollo senza agitatore:** Incubare per 2 ore  $\pm$  5 minuti a temperatura ambiente.  
**Per il protocollo con agitatore:** Incubare per 1 ora  $\pm$  5 minuti a temperatura ambiente su un agitatore orbitale orizzontale (0,12" orbita) impostato a 500  $\pm$  50 rpm.
5. Aspirare o decantare completamente il contenuto di ogni pozzetto, asciugare su carta assorbente pulita. Non lavare.
6. Aggiungere 200 µL di coniugato ad ogni pozzetto. Coprire la piastra con un nuovo adesivo.  
**Per il protocollo senza agitatore:** Incubare per 2 ore  $\pm$  5 minuti a temperatura ambiente.  
**Per il protocollo con agitatore:** Incubare per 1 ora  $\pm$  5 minuti a temperatura ambiente su un agitatore orbitale orizzontale.
7. Aspirare ogni pozzetto e lavarlo, ripetere il procedimento tre volte per un totale di quattro lavaggi. Lavare riempiendo ogni pozzetto con il tampone di lavaggio (400 µL) utilizzando una pipetta, o un lavatore automatico. La rimozione di tutto il liquido di lavaggio ad ogni passaggio è essenziale per la buona riuscita del test. Dopo l'ultimo lavaggio, rimuovere tutto il rimanente del tampone di lavaggio aspirando o decantando. Girare la piastra e tamponarla contro carta assorbente.
8. Aggiungere 200 µL di soluzione substrato in ogni pozzetto (Nota: la soluzione substrato deve essere usata entro 15 minuti dalla preparazione). Incubare per 20-25 minuti a temperatura ambiente sul banco.
9. Aggiungere 100 µL di Soluzione Stop ad ogni pozzetto. Se la variazione di colore non appare uniforme, scuotere molto delicatamente la micropiasta assicurarsi di miscelare completamente.
10. Determinare la densità ottica (D.O.) di ogni pozzetto entro 15 minuti, usare un lettore di micropiastre impostato a 450 nm . Se la correzione della lunghezza d'onda è disponibile, impostarla a 600 nm. Se la correzione non è disponibile, sottrarre le letture a 600nm dalle letture a 450 nm. Questa sottrazione correggerà le imperfezioni ottiche della piastra. La lettura fatta direttamente a 450 nm senza correzione può risultare elevata e imprecisa.

## SCHEMA DELLA PIASTRA

Un diagramma di esempio per gli standard, i controlli e i campioni è mostrato di seguito.



## CALCOLO DEI RISULTATI

Leggere l'assorbanza di ogni pozzetto utilizzando un lettore di micropiastre a 450nm come lunghezza d'onda primaria e a 600nm come lunghezza d'onda di riferimento (540, 570 o 650 nm sono consentiti).

Fare la media delle letture degli standard, controlli e campioni e sottrarre il valore medio di densità ottica standard a 0 mIU/mL.

Creare una curva standard convertendo i dati usando un software capace di generare dai dati stessi una curva logistica a 4 parametri (4PL). Come alternativa, costruire una curva standard ordinando la media di assorbanza di ogni standard sull'asse y e la concentrazione sull'asse x e disegnare la curva che meglio si adatta ai punti del grafico. I dati possono essere linearizzati mettendo nel diagramma il logaritmo delle concentrazioni di Epo e il logaritmo della densità ottica, l'analisi di regressione determinerà la miglior linea di interpolazione. Questa procedura produrrà un adeguato ma meno preciso adattamento dei dati.

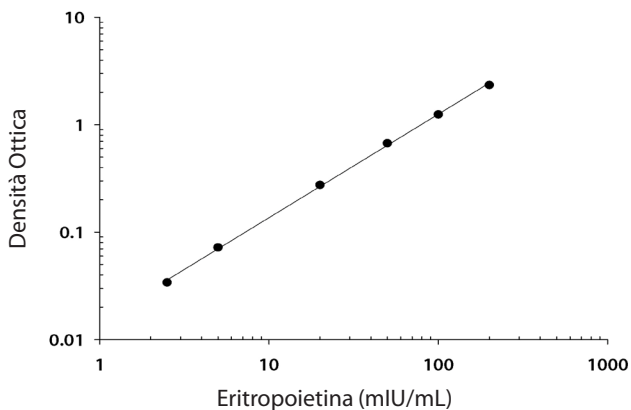
Riportare i valori sconosciuti che vengono letti dentro il range (2,5-200 mIU/mL) del dosaggio. Per i valori sconosciuti che vanno oltre il range, vedere la sezione Diluizione dei Campioni con alta concentrazione di Epo.

Per valori al di sotto del range, indicarli come non rilevabili o <2,5 mIU/mL.

## RISULTATI TIPO

Le curve standard riportate sono fornite a solo scopo dimostrativo. La curva standard deve essere generata per ogni gruppo di campioni dosato.

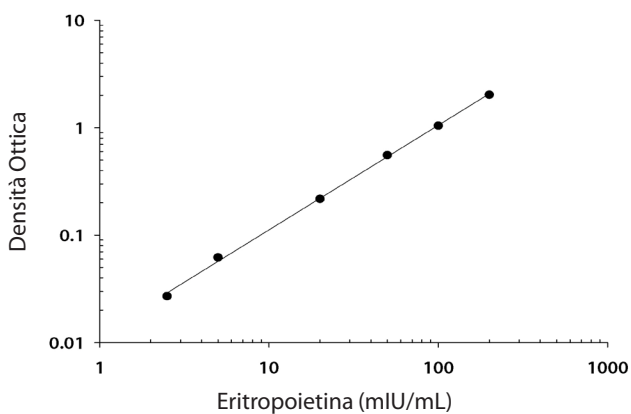
### Protocollo senza agitatore



### Protocollo senza agitatore

| (mIU/mL) | O.D.  | Media | Corretto |
|----------|-------|-------|----------|
| 0        | 0,072 |       |          |
| 0        | 0,074 | 0,073 | —        |
| 2,5      | 0,106 |       |          |
| 2,5      | 0,108 | 0,107 | 0,034    |
| 5        | 0,144 |       |          |
| 5        | 0,146 | 0,145 | 0,072    |
| 20       | 0,342 |       |          |
| 20       | 0,353 | 0,348 | 0,275    |
| 50       | 0,743 |       |          |
| 50       | 0,746 | 0,744 | 0,671    |
| 100      | 1,298 |       |          |
| 100      | 1,340 | 1,319 | 1,246    |
| 200      | 2,366 |       |          |
| 200      | 2,463 | 2,414 | 2,341    |

### Protocollo con agitatore



### Protocollo con agitatore

| (mIU/mL) | O.D.  | Media | Corretto |
|----------|-------|-------|----------|
| 0        | 0,045 |       |          |
| 0        | 0,047 | 0,046 | —        |
| 2,5      | 0,070 |       |          |
| 2,5      | 0,076 | 0,073 | 0,027    |
| 5        | 0,107 |       |          |
| 5        | 0,108 | 0,108 | 0,062    |
| 20       | 0,263 |       |          |
| 20       | 0,263 | 0,263 | 0,217    |
| 50       | 0,597 |       |          |
| 50       | 0,608 | 0,602 | 0,556    |
| 100      | 1,081 |       |          |
| 100      | 1,098 | 1,090 | 1,044    |
| 200      | 2,008 |       |          |
| 200      | 2,136 | 2,072 | 2,026    |

## DILUZIONE DEI CAMPIONI CON ALTA CONCENTRAZIONE DI EPO

Se un campione di siero o plasma è sopra i 200 mIU/mL, diluirlo con il diluente per campioni.

Ad esempio:

- Per campioni con una concentrazione di Epo tra i 200 mIU/mL e i 2000 mIU/mL , una diluizione di 10 volte è necessaria. Diluire 25µL di campione in 225 µL di diluente per campione.
- Per campioni con una concentrazione di Epo oltre i 2000 mIU/mL, una diluizione maggiore sarà necessaria per riportarli entro il range della curva standard (ad es. 20 volte, 40 volte di diluizione).

**Nota:** Utilizzare provette in polipropilene o polietilene ad alta densità (HDPE) per le diluizioni dei campioni. **NON UTILIZZARE PROVETTE IN VETRO.** L'uso di provette in vetro causerà dei risultati errati dovuti all'assorbimento di Epo sul vetro.

Per ottenere la concentrazione di Epo nei sieri o nei plasmi, moltiplicare il risultato ottenuto per il fattore di diluizione.

## CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio deve stabilire un programma di controllo qualità per controllare la performance del Quantikine IVD Epo. Come parte di questo programma, controlli con concentrazione nota di Epo (disponibili da R&D Systems) devono essere inseriti in ogni dosaggio. R&D Systems raccomanda che almeno due controlli devono essere inseriti per verificare la performance del dosaggio. Un controllo nella regione medio-alta del range normale e uno regione media della curva sono una buona scelta per una valutazione ripetibile della performance del dosaggio. Un controllo può essere inserito anche nella fascia alta della curva per controllare i valori limite alti. Se i valori ottenuti non sono nei range prestabiliti, i risultati del dosaggio possono non essere validi.

I risultati dei singoli dosaggi sono validi se i risultati dei controlli sono dentro i valori dichiarati dai controlli commerciali o dai controlli fatti in casa. Il coefficiente di correlazione della curva standard deve essere  $\geq 0,95$ .

## GUIDA ALLA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Generalmente la non riuscita del dosaggio è dovuta ad errori tecnici, errori strumentali o problemi nei reagenti. Quando il dosaggio non funziona, controllare la data di scadenza di ogni singolo componente e accertarsi che siano stati stoccati come indicato sull'etichetta del prodotto. Inoltre verificate le indicazioni sulla Stabilità e Scadenza nella apposita sessione. Se il dosaggio è discutibile o si presenta un problema durante il dosaggio, potrete evidenziare il problema facendo riferimento alla tabella sottostante.

| PROBLEMA  | POSSIBILE CAUSA   | CONTROLLO O RISOLUZIONE   |
|---|---|---|
| <b>Alta % di C.V.s</b><br>(alta variabilità dei duplicati in rapporto ai normali requisiti di precisione intra laboratorio) | Lavaggio incompleto dei pozzetti  | Assicurarsi che la postazione di lavaggio lavori correttamente  |
|   | Inadeguata aspirazione dei pozzetti   | I pozzetti devono apparire asciutti   |
|   | Miscelazione incompleta dei reagenti colori A e B                           | Assicurarsi di miscelare adeguatamente  |
|   | L'agitatore spruzza il contenuto dei pozzetti sulla copertura della piastra | Regolare l'agitatore a $500 \pm 50$ rpm   |
| <b>Delta basso</b> (D.O. < 0,015)<br><b>o alto fondo</b>  | Lavaggio incompleto dei pozzetti  | Assicurarsi che la postazione di lavaggio lavori correttamente  |
|   | Inadeguata aspirazione dei pozzetti   | Assicurarsi di miscelare adeguatamente  |
|   | Volumi difformi sono stati aggiunti nei pozzetti                            | Verificare la taratura delle provette e lavorare in modo adeguato   |
|   | Reagenti colori A e B preparati troppo presto                               | Le Soluzioni Substrato devono essere preparate 15 minuti prima  |
| <b>Bassa correlazione della curva standard</b> ( $r < 0,95$ )   | Errore di pipettamento  | Considerare se necessario rielaborare i dati seguendo le procedure interne  |
| <b>Sviluppo del colore inadeguato</b>   | Inadeguata aspirazione dei pozzetti   | Assicurarsi di miscelare adeguatamente  |
|   | Volumi difformi sono stati aggiunti nei pozzetti                            | Verificare la taratura delle provette e lavorare in modo adeguato   |
|   | Tempi di incubazione errati o temperature sbagliate                         | Seguire esattamente i tempi e le temperature raccomandate   |
|   | Fallimento del coniugato o della Soluzione Substrato                        | Miscelare in volumi uguali (ad es 100 $\mu$ L cad.) il reagente Colore A e B e il Coniugato di Epo. Il colore deve svilupparsi subito |
| <b>L'agitatore spruzza il contenuto dei pozzetti sulla copertura della piastra</b>  | L'agitatore ha rpm troppo veloci  | Regolare l'agitatore a $500 \pm 50$ rpm   |

**Range Normale**

Il range normale per il siero e il plasma EDTA è stato determinato usando il Quantikine IVD Epo ELISA. La concentrazione di Eritropoietina è stata ottenuta da 123 donatori normali provenienti dalla zona di Minneapolis/St.Paul, Minnesota, USA.

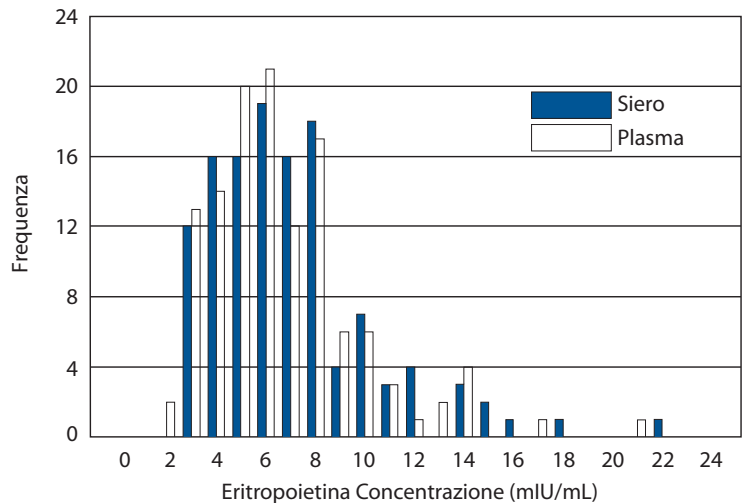
Utilizzando il metodo non parametrico per l'analisi dei valori di riferimento evidenziato nella pubblicazione del NCCLS "Come definire, determinare e utilizzare gli intervalli di riferimento nel laboratorio clinico" (documento NCCLS C28-P; Vol. 12, No. 2), i seguenti range di riferimento (2,5-97,5 percentile) sono stati stabiliti nel siero e nel plasma EDTA.

Ogni laboratorio deve stabilire i suoi range di normalità.

**Epo Range Normali**

| Siero           | EDTA plasma     |
|-----------------|-----------------|
| 3,3-16,6 mIU/mL | 3,1-14,9 mIU/mL |

Distribuzione dei Valori Normali di Epo (n=123)



**Range patologici**

Pazienti con la policitemia vera rubra possono avere concentrazioni di Epo entro il range dei normali, mentre chi soffre di policitemia secondaria può avere concentrazioni elevate di Epo nel siero. Pazienti con policitemia vera rubra che sono sottoposti a flebotomia possono avere valori elevati della concentrazione di Epo nel siero.

Pazienti che soffrono della maggior parte delle anemie, presenteranno valori superiori ai normali della concentrazione di Epo nel siero, mentre chi soffre di anemia associata a insufficienza renale cronica può avere livelli della concentrazione di Epo entro valori normali. Pazienti anemici sottoposti a trasfusioni, possono mostrare valori inferiori a quelli attesi di concentrazione di Epo nel siero.

Valori alti anormali di concentrazione di Epo nel siero possono essere riscontrati in diverse altre patologie incluso neoplasmi renali, tumori benigni, malattie policistiche del rene, cisti renali e idronefrosi.

I risultati di questo dosaggio devono essere utilizzati insieme alle informazioni cliniche disponibili e ad altre procedure diagnostiche.