

Quantikine® IVD® ELISA

Συμπληρωματικό Ένθετο Συσκευασίας για τον Ανοσοπροσδιορισμό της Ανθρώπινης Ερυθροποιητίνης (Epo)

Αριθμός Καταλόγου DEP00

Αυτό το συμπληρωματικό ένθετο συσκευασίας περιέχει το πρωτόκολλο της ανάλυσης και πρέπει να το διαβάσετε ολόκληρο πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν. Για χαρακτηριστικά απόδοσης και βιβλιογραφικές αναφορές, καθώς και για την αγγλική έκδοση του πρωτοκόλλου, ανατρέξτε στο κύριο ένθετο της συσκευασίας.



IVD ΜΟΝΟ ΓΙΑ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΗ

 **ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΔΙΑΝΟΜΗ ΑΠΟ:**

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

EC **REP** **ΔΙΑΝΟΜΗ ΑΠΟ:**

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

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περιεχόμενα

Σελίδα

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	2
ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ	2
ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ / ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ.....	3
ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΣΤΑΘΕΙΑ Η ΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ.....	3
ΑΛΛΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ	4
ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	4
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ	4
ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ.....	5
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	5
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	6
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑΣ	7
ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	8
ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.....	8
ΑΡΑΙΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΕ ΕΡΟ	9
ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ.....	9
ΟΔΗΓΙΕΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ	10
ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ	11

ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Ανοσοενζυμική μέθοδος (Enzyme linked immunosorbent assay-ELISA) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ερυθροποιητίνης στον ανθρώπινο ορό και στο πλάσμα, ώστε να βοηθηθεί η διάγνωση της αναιμίας και της πολυκυτταραιμίας.




ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το κιτ Quantikine IVD Ερο ELISA είναι βασισμένο στη μέθοδο του sandwich (σάντουιτς) με διπλό αντίσωμα. Τα πηγαδάκια της πλάκας είναι επιστρωμένα με μονοκλωνικό (μυοειδούς-ποντικού) αντίσωμα ειδικό για Ερο επωάζονται με άγνωστο δείγμα ή δείγμα γνωστής συγκέντρωσης -στάνταρτ (standard). Η ερυθροποιητίνη δεσμεύεται στο ακινητοποιημένο αντίσωμα της πλάκας. Στη συνέχεια αφού απομακρυνθεί η περίσσεια των δειγμάτων (γνωστών και άγνωστων) τα πηγαδάκια επωάζονται με ένα πολυκλωνικό αντι-Ερο αντίσωμα (κουνελιού) το οποίο είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο horseradish περοξειδάση (peroxidase). Κατά τη διάρκεια της δεύτερης επώασης το σύμπλεγμα αντισώματος-ενζύμου συνδέεται στην ακινητοποιημένη Ερο. Η περίσσεια του συμπλέγματος απομακρύνεται με εκπλύσεις. Ένα χρωμογόνο προστίθεται μέσα στα πηγαδάκια και οξειδώνεται από την αντίδραση του ενζύμου ώστε να εμφανιστεί ένα σύμπλοκο μπλε χρώματος. Η αντίδραση διακόπτεται από ένα οξύ που μετατρέπει το μπλε χρώμα σε κίτρινο. Το παραγώμενο χρώμα είναι ανάλογο της ποσότητας του συμπλόκου που συνδέθηκε με το σύμπλεγμα του επιστρωμένου αντισώματος και Ερο, το οποίο με τη σειρά του είναι ανάλογο με την ποσότητα της Ερο του δείγματος (γνωστού ή άγνωστου). Στη συνέχεια μετράται η απορρόφηση του συμπλόκου και δημιουργείται μία καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιώντας τις τιμές της απορρόφησης έναντι των συγκεντρώσεων της Ερο για τα γνωστά δείγματα. Η συγκέντρωση της Ερο στα άγνωστα δείγματα προσδιορίζεται συγκρίνοντας την οπτική πυκνότητα του δείγματος με την καμπύλη αναφοράς των γνωστών δειγμάτων. Τα γνωστά δείγματα που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη μέθοδο αποτελούνται από ανασυνδιασμένη ανθρώπινη Ερο βαθμονομημένη σύμφωνα με το Second International Reference Preparation (67/343), η οποία αποτελεί μία μορφή ανθρώπινης ερυθροποιητίνης παραγόμενη στα ούρα.

ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

SORB	Πλάκα μικροπροσδιορισμού ερυθροποιητίνης (Part 890126) - μικροπλάκα πολυουρενίου 96 πηγαδίων (12 σειρές των 8 πηγαδίων) επιστρωμένη με μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της ανασυνδυσασμένης ανθρώπινης ΕΡΟ.	
CONJ	Σύμπλεγμα ενζύμου και πολυκλωνικού ερυθροποιητίνης (Part 890127) - 21,5 mL από πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι της ανασυνδυσασμένης ανθρώπινης ερυθροποιητίνης συνδεδεμένο με horseradish υεροξειδάση, περιεχει συντηρητικά.	
CAL	0	Ερυθροποιητίνη 0.0 mIU/mL Γνωστό δείγμα (Part 890128) - 2,1 mL από πρωτεϊνική βάση σε ρυθμιστικό διάλυμα, περιεχει συντηρητικό.
CAL	2.5	Ερυθροποιητίνη 2.5 mIU/mL Γνωστό δείγμα (Part 890129) - 2,1 mL ανσυνδιασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα, περιεχει συντηρητικό.
CAL	5	Ερυθροποιητίνη 5.0 mIU/mL Γνωστό δείγμα (Part 890130) - 2,1 mL ανσυνδιασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα, περιεχει συντηρητικό.
CAL	20	Ερυθροποιητίνη 20.0 mIU/mL Γνωστό δείγμα (Part 890131) - 2,1 mL ανσυνδιασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα, περιεχει συντηρητικό.
CAL	50	Ερυθροποιητίνη 50.0 mIU/mL Γνωστό δείγμα (Part 890132) - 2,1 mL ανσυνδιασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα, περιεχει συντηρητικό.
CAL	100	Ερυθροποιητίνη 100.0 mIU/mL Γνωστό δείγμα (Part 890133) - 2,1 mL ανσυνδιασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα, περιεχει συντηρητικό.
CAL	200	Ερυθροποιητίνη 200.0 mIU/mL Γνωστό δείγμα (Part 890134) - 2,1 mL ανσυνδιασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα, περιεχει συντηρητικό.
DIL	AS	Διαλύτης της μεθόδου της ερυθροποιητίνης (Part 895057) - 11 mL πρωτεϊνικής βάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα. Περιέχει αζίδιο του νατρίου.
DIL	SPE	Διαλύτης δείγματος (Part 895058) - 26 mL πρωτεϊνικής βάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα, περιεχει συντηρητικό.
BUF	WASH	25X Συμπυκνωμένο διάλυμα έκλυσης ερυθροποιητίνης (Part 895059) - 100 mL 25X συμπυκνωμένο διάλυμα. Περιέχει Συντηρητικό.
SUBS	A	Αντιδραστήριο χρώματος Α (Part 895549) - 12 mL αντιδραστήριο χρώματος Α (0,35 g/L τετραμέθυλβενζιδίνη)
SUBS	B	Αντιδραστήριο χρώματος Β (Part 895550) - 12 mL αντιδραστήριο χρώματος Β (0,01 N ρυθμιστικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου).
SOLN	STOP	Διάλυμα Διακοπής της αντίδρασης (Part 895060) - 11 mL 2N θειικού οξέος. Προσοχή: καυστικό υλικό. Φορέστε προστατευτικά ματιών, χεριών, προσώπου και ρούχων. Πλύνετε τα χέρια σας μετά τον χειρισμό του αντιδραστήριου.

ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Κλειστή συσκευασία του kit	Αποθήκευση στους 2-8° C. Μη χρησιμοποιείται το kit μετά την ημερομηνία λήξης του .		
Ανοιχτή συσκευασία/ διαλυμένα αντιδραστήρια	Αραιωμένο διάλυμα έκλυσης	Μπορεί να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία δωματίου (20-25° C) μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.	
	Διάλυμα διακοπής της αντίδρασης	Αποθηκεύστε στους 2-8° C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.	
	Διαλύτης δείγματος		
	Διαλύτης μεθόδου		
	Σύμπλεγμα ενζύμου (conjugate)		
	Μη αναμειγμένο αντιδραστήριο χρώματος Α		
	Μη αναμειγμένο αντιδραστήριο χρώματος Β		
	Γνωστά δείγματα (0,0-200 mIU/mL)		
Πηγαδάκια της μικροπλάκας	Επιστρέψτε τα αχρησιμοποίητα πηγαδάκια στη σακούλα από αλουμινόχαρτο το οποίο περιέχει ξηραντικό υλικό. Επαυσψραγίστε τις άκρες. Αποθηκεύστε στους 2-8° C μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit.		

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ / ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Για In Vitro Διάγνωση

- Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια του kit μετά την ημερομηνία λήξης του.
- Για καλύτερα αποτελέσματα, κάθε εργαστήριο πρέπει να αξιολογήσει ποια ειδική μεθοδολογία θα ακολουθηθεί (Benchtop or Shaker) και να εκτελεί όλες τις εξετάσεις με τη μέθοδο αυτή.
- Για την ελαχιστοποίηση των αποκλίσεων των τιμών μεταξύ των δειγμάτων μιας διαδικασίας συνίσταται η διανομή των αντιδραστηρίων να γίνει μέσα 15 λεπτά.
- Μην αντικαθιστάτε τα αντιδραστήρια του kit με αντιδραστήρια άλλου kit ή διαφορετικού lot ή από διαφορετικές πηγές.
- Μην εκθέτετε τα αντιδραστήρια του kit σε ισχυρό φωτισμό κατά την διάρκεια της αποθήκευσης ή της επώασης.
- Να αποφεύγεται η επαφή των αντιδραστηρίων του kit με οξειδωτικούς παράγοντες και μέταλλα.
- Το σύμπλεγμα (Conjugate) απενεργοποιείται με την έκθεσή του σε αζίδιο του νατρίου.
- Να μη γίνεται με το στόμα η αναρρόφηση και διανομή των αντιδραστηρίων.
- Μη καπνίζετε και μη τρώτε σε χώρους όπου χειρίζεστε τα αντιδραστήρια του kit ή δείγματα.
- Αποφεύγετε την επαφή των αντιδραστηρίων ή των δειγμάτων με το δέρμα και με βλεννογόνους.
- Εάν το αντιδραστήριο χρώματος ή το Διάλυμα Διακοπής (2 N sulfuric acid) έρθει σε επαφή με τα μάτια ή το δέρμα, κάντε επαναλαμβανόμενες πλύσεις με μεγάλες ποσότητες νερού και καλέστε γιατρό.
- Ο χειρισμός του ορού και των υλικών που έχουν έλθει σε επαφή με τον ορό γίνεται σύμφωνα με τις οδηγίες του NCCLS για την αποφυγή της μεταφοράς παθογόνων από τα παράγωγα αίματος κατά τις εργαστηριακές διαδικασίες.
- Όταν οι χρόνοι επώασης και θερμοκρασίες είναι διαφορετικές από αυτές που προτείνονται τότε μπορεί να υπάρξουν εσφαλμένα αποτελέσματα.
- Εσφαλμένα αποτελέσματα μπορεί να προκληθούν και από την επιμόλυνση των αντιδραστηρίων του kit.
- Αν είναι δυνατό, να χρησιμοποιούνται πλαστικά αναλώσιμα, ρύγχη και δοχεία για την προετοιμασία των αντιδραστηρίων και την αποθήκευσή τους. Τα γυάλινα σκεύη πρέπει να ξεπλένονται επιμελώς με 1N θειικό ή 1N υδροχλωρικό οξύ και να ακολουθούν τουλάχιστον τρεις πλύσεις με απιονισμένο νερό. Στο γυάλινο σκεύος δεν θα πρέπει να έχουμε υπόλειμμα απορρυπαντικού ή οξέος.
- Για τις αραιώσεις των δειγμάτων να χρησιμοποιούνται δοκιμαστικά φιαλίδια πολυπροπυλενίου ή υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου (HDPE). **ΝΑ ΜΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΥΑΛΙΝΑ ΦΙΑΛΙΔΙΑ.**
- Μερικά συστατικά του kit περιέχουν αζίδιο του νατρίου που μπορεί να αντιδράσει με τον μόλυβδο και τον χαλκό των σωλήνων και να σχηματίσει εκρηκτικές ενώσεις μετάλλων. Κατά την απομάκρυνσή τους να ξεπλένεται με άφθονη ποσότητα νερού.

ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΣΤΑΘΕΙΑ Η ΤΗΝ ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Το διάλυμα υποστρώματος (substrate) πρέπει να είναι άχρωμο σε όλες τις περιπτώσεις. Γενικά, η ύπαρξη ιζήματος στα αντιδραστήρια είναι ενδεικτικό της αστάθειας ή της αποικοδόμησης ενός αντιδραστηρίου. Αν παρατηρηθεί κάτι τέτοιο ή αν ο συντελεστής συσχέτισης της καμπύλης είναι μικρότερος από 0,95, κρατήστε τα αντιδραστήρια σε αμφοβητω στους 2-8° C και επικοινωνήστε με την R&D Systems Europe: +44 (0)1235 529449.

ΑΛΛΑ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ

- Πιπέτες και ρύγχη πιπετών.
- Ανακινητήρας μικροπλακών με οριζόντια περιστροφική κίνηση (0,12" στροφή) ικανό να έχει σταθερή ταχύτητα 500 ± 50 rpm (μόνο όταν ακολουθούμε το Πρωτόκολλο Ανακινητήρος).
- Βαθμονομημένοι ογκομετρικοί κύλινδροι των 100 mL και των 4 λίτρων.
- Πολυκάναλη πιπέτα, υδροβολέας, πολυκάναλος διανομέας πλυστικού ή αυτόματο πλυστικό μικροπλακών.
- Διηθητικός χάρτης ή χαρτί για την απορρόφηση του υγρού από τα πηγάδια.
- Φωτόμετρο μικροπλακών που να μετράει απορρόφηση στα 450 nm και διορθωτικό φίλτρο στα 600 nm.
- Δίσκοι για τα αντιδραστήρια του ανοσοπροσδιορισμού.
- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό.
- Έναν υπολογιστή ικανό να κάνει καμπύλη 4 παραμέτρων για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων.
- Ορός(οι) εσωτερικού ελέγχου ερυθροποιητίνης (Serum Control(s),) π.χ., Quantikine IVD Human Serum Control 1 και 2, και Control 3 (διατίθενται από την R&D Systems, Cat. No. CEP01 και CEP03 αντίστοιχα).

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Τα αποτελέσματα της μεθόδου ποσοτικοποιούνται με φωτομέτρηση στα 450 nm χρησιμοποιώντας ένα φωτόμετρο μικροπλακών. Για καλύτερα αποτελέσματα πρέπει να περιλαμβάνεται και ένα φίλτρο αναφοράς στα 600 nm (540 nm, 570 nm, και 650 nm μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν) για την διόρθωση των μετρήσεων από τις ατέλειες που προκαλεί στην τιμή της οπτικής απορρόφησης το πολυστυρένιο των μικροπλακών. Μηχανήματα χωρίς τα φίλτρα αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθούν αλλά θα είναι μειωμένη η ακρίβεια της μεθόδου. Προτείνεται ένα φωτόμετρο μικροπλακών με ένα εύρος οπτικής πυκνότητας 0-3 O.D και ακρίβεια $\pm 0,005$ O.D. Φωτόμετρο μικροπλακών με εύρος μικρότερο από 0-3 O.D μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί αλλά θα μειωθεί το εύρος της μεθόδου.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με άλλες διαθέσιμες πληροφορίες από κλινικούς ελέγχους και άλλες διαγνωστικές εξετάσεις.
- Κανένα φάρμακο δεν έχει διερευνηθεί για αλληλεπιδράσεις με τη μέθοδο
- Αν τα δείγματα παράγουν τιμές υψηλότερες από το υψηλότερο γνωστό δείγμα, αραιώστε τα δείγματα αυτά στο διαλύτη δειγμάτων και επαναλάβετε την μέθοδο.
- Κάθε μεταβολή στον χειρισμό, τεχνική διανομής των αντιδραστηρίων, τεχνική έκπλυσης, χρόνος επώασης ή θερμοκρασία καθώς και η ηλικία του kit, μπορεί να προκαλέσουν διαφοροποιήσεις στην πρόσδεση του αντισώματος.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Ορός – Χρησιμοποιήστε διαχωριστή ορού ή φιαλίδια τύπου clot tube και αφήστε τα δείγματα να πήξουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25° C). Φυγοκεντρίστε τα δείγματα για 15 λεπτά με ταχύτητα 760 x g* σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία αυτή πρέπει να πραγματοποιηθεί σε διάστημα 30 λεπτών από τη συλλογή τους ώστε να αποφευχθεί η αιμόλυση. Διαχωρίστε κάθε δείγμα σε ίσους όγκους χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα φιαλίδια, αποθηκεύστε τα στους 2-8° C μέχρι 7 ημέρες, ή για μακροχρόνια αποθήκευση σε θερμοκρασία ≤ -10° C χρησιμοποιώντας κατάψυξη χωρίς αυτοαπόψυξη. **Αποφεύγετε τις επανειλημμένες ψύξεις-αποψύξεις των δειγμάτων.**

Πλάσμα – Συλλέγετε το πλάσμα χρησιμοποιώντας EDTA σαν αντιπηκτικό. Μέσα σε 30 λεπτά από τη συλλογή φυγοκεντρίστε τα δείγματα με ταχύτητα 760 x g* για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Διαχωρίστε κάθε δείγμα σε ίσους όγκους χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα φιαλίδια, αποθηκεύστε τα στους 2-8° C μέχρι 7 ημέρες, ή για μακροχρόνια αποθήκευση σε θερμοκρασία ≤ -10° C χρησιμοποιώντας κατάψυξη χωρίς αυτοαπόψυξη. **Αποφεύγεται τις επανειλημμένες ψύξεις-αποψύξεις των δειγμάτων.**

Συνίσταται σε κάθε εργαστήριο που χρησιμοποιεί μέθοδο με ορό ή πλάσμα να σταθεροποιεί τις συνθήκες του.

Λιπαιμικά, αιμολυμένα ή επιμολυσμένα δείγματα ίσως να παράγουν ανακριβή αποτελέσματα και δεν πρέπει να ελέγχονται με αυτή τη διαδικασία. Επιπλέον κανένα φάρμακο δεν έχει διερευνηθεί για αλληλεπιδράσεις με τη μέθοδο.

Συμφωνα μες οδηγίες NCCLS: Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens. (NCCLS Παράγραφος H18; νεώτερη εκδοση).

* g = (1,118 X 10⁻⁵) (ακτίνα σε cm) (rpm)²

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Πριν τη χρήση του kit φέρνουμε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου (20-25° C).

Διάλυμα έκπλυσης (wash buffer) (1X) – αν έχουν δημιουργηθεί κρύσταλλοι στο περιεχόμενο του διαλύματος, αφήστε το να ζεσταθεί σε θερμοκρασία δωματίου και αναμίξτε το μέχρι να διαλυθούν τελείως οι κρύσταλλοι. Αραιώστε 100 mL Διαλύματος Εκπλυσης (1X). Χρησιμοποιώντας απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό για τη παρασκευή 2500 mL Διαλύματος Εκπλυσης (1X).

Διάλυμα Υποστρώματος – Ισοί όγκοι αντιδραστηρίων χρώματος A και B πρέπει να αναμιχθούν το πολύ 15 λεπτά πριν τη χρήση. Ο απαιτούμενος όγκος τελικού διαλύματος υποστρώματος είναι 200 μL ανά πηγαδάκι. Απομακρύνετε την υπολειπόμενη ποσότητα τελικού διαλύματος υποστρώματος.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΑΡΙΘΜΟ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ		
Συνολικός αριθμός Πηγαδιών	Όγκος αντιδραστηρίου χρώματος A	Όγκος αντιδραστηρίου χρώματος B
96	11 mL	11 mL
48	6 mL	6 mL
32	4 mL	4 mL

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Πριν τη χρήση του κιτ φέρνουμε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου (20-25° C). Προτείνεται ο έλεγχος όλων των γνωστών και άγνωστων δειγμάτων καθώς και των δειγμάτων του εσωτερικού ελέγχου της μεθόδου (controls) να γίνεται εις διπλούν. Διατίθενται τα πρωτόκολλα Πάγκου και Ανακινητήρος. Κατά τη διάρκεια της εξέτασης πρέπει να ακολουθείται το ίδιο πρωτόκολλο.

1. Ετοιμάστε όλα τα αντιδραστήρια όπως περιγράφεται στην αμέσως προηγούμενη παράγραφο.
2. Απομακρύνετε από το πλαίσιο της μικροπλάκας τις σειρές των πηγαδιών (strips) που περισσεύουν, επιστρέψτε τα στη σακούλα από αλουμίνιο που περιέχει το ξηραντικό υλικό, και επανασφραγίστε τις άκρες.
3. Διανέμετε 100 μ L του Διαλύτη μεθόδου Ero (Ero Assay Diluent) σε κάθε πηγαδάκι.
4. Προσθέστε 100 μ L γνωστού δείγματος (standard), δείγματος εσωτερικού ελέγχου της μεθόδου (control) ή αγνώστου δείγματος ανά πηγαδάκι. Ανακινήστε ελαφρώς το πλαίσιο της μικροπλάκας για περίπου 1 λεπτό, ώστε να αναμειχθεί καλά το περιεχόμενο των πηγαδιών. Καλύψτε την πλάκα με τα παρεχόμενα καλύμματα των σειρών των πηγαδιών. Στη σελίδα 56 θα βρείτε ένα ενδεικτικό προσχέδιο της μικροπλάκας που περιλαμβάνει τα γνωστά δείγματα, τα άγνωστα καθώς και τα δείγματα εσωτερικού ελέγχου.
Για το Πρωτόκολλο Πάγκου: Επώαστε για 2 ώρες \pm 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
Για το Πρωτόκολλο Ανακινητήρος: Επώαστε για 1 ώρα \pm 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε ανακινητήρα μικροπλάκων με οριζόντια περιστροφική κίνηση (0,12" στροφή) σταθερής ταχύτητας 500 \pm 50 rpm.
5. Απομακρύνετε ή αναρροφήστε πλήρως το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού. Αφυγράνετε με καθαρό απορροφητικό χαρτί. **Μη Πλένετε την μικροπλάκα.**
6. Προσθέστε 200 μ L Ero Conjugate σε κάθε πηγαδάκι. Καλύψτε την πλάκα με ένα νέο κάλυμμα.
Για το Πρωτόκολλο Πάγκου (benchtop protocol): Επώαστε για 2 ώρες \pm 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
Για το Πρωτόκολλο Ανακινητήρος (shaker protocol): Επώαστε για 1 ώρα \pm 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε ανακινητήρα μικροπλάκων με οριζόντια περιστροφική κίνηση (0,12" στροφή) σταθερής ταχύτητας 500 \pm 100 rpm.
7. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε πηγαδιού και πλύνετε, επαναλαμβάνοντας τη διαδικασία 3 φορές (4 εκπλύσεις συνολικά). Η έκπλυση πραγματοποιείται γεμίζοντας κάθε πηγαδάκι με Διάλυμα Εκπλύσης (wash buffer) (400 μ L) χρησιμοποιώντας υδροβολέα ή διανεμητή ή αυτόματο πλυστικό. Μετά την τελευταία πλύση απομακρύνετε το εναπομείναν διάλυμα με αναρρόφηση ή μεταγγίζοντάς το αλλού. Αναποδογυρίστε την πλάκα και στεγνώστε την περίσσεια διαλύματος σε καθαρό απορροφητικό χαρτί.
8. Προσθέστε 200 μ L διαλύματος υποστρώματος σε κάθε πηγαδάκι (**Σημείωση:** το διάλυμα υποστρώματος πρέπει να χρησιμοποιηθεί μέσα σε 15 λεπτά από την ετοιμασία του διαλύματος). Επώαστε για 20-25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στον πάγκο.
9. Προσθέστε 100 μ L Διαλύματος Διακοπής (stop solution) σε κάθε πηγαδάκι. Αν η αλλαγή του χρώματος δεν είναι ομοιόμορφη χτυπήστε ελαφρώς τη πλάκα για να επιτευχθεί σωστή ανάμειξη.
10. Μετρήστε την οπτική πυκνότητα (O.D.) σε κάθε πηγαδάκι μέσα σε 15 λεπτά, χρησιμοποιώντας ένα φωτόμετρο μικροπλάκων προγραμματισμένο στα 450 nm. Αν είναι διαθέσιμο και ένα μήκος κύματος για διόρθωση ρυθμίστε το στα 600 nm. Αν το διορθωτικό φίλτρο δεν είναι διαθέσιμο τότε αφαιρέστε τις τιμές των 600 nm από τις τιμές των 450 nm. Αυτή η αφαίρεση θα διορθώσει τυχόν ανακρίβειες στην οπτική απορρόφηση της πλάκας. Μετρήσεις που γίνονται χωρίς διόρθωση μόνο στα 450 nm, μπορεί να δώσουν υψηλότερες τιμές και να είναι λιγότερο ακριβείς.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΠΛΑΚΑΣ

Ένα ενδεικτικό προσχέδιο για θέσεις των δειγμάτων, γνωστών, αγνώστων και εσωτερικού ελέγχου, παρουσιάζεται ακολούθως.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	Cntrl 2	Cntrl 2	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31
B	2.5	2.5	Cntrl 3	Cntrl 3	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32
C	5	5	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33
D	20	20	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34
E	50	50	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35
F	100	100	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
G	200	200	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
H	Cntrl 1	Cntrl 1	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Μετρήστε την απορρόφηση κάθε πηγαδιού σε ένα φωτόμετρο μικροπλακών χρησιμοποιώντας τα 450 nm σαν το κύριο μήκος κύματος και 600 nm σαν μήκος κύματος αναφοράς (επιτρεπτά είναι και τα 540, 570, ή 650 nm).

Υπολογίστε το μέσο όρο των διπλών επαναλήψεων για κάθε τύπο δείγματος και αφαιρέστε το μέσο όρο των τιμών της οπτικής πυκνότητας του γνωστού δείγματος με συγκέντρωση 0,0 mlU/mL από το καθένα.

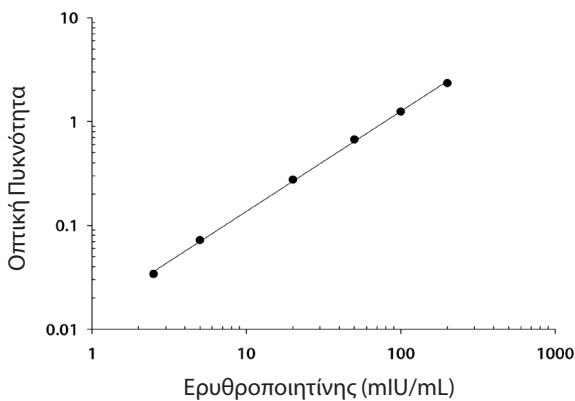
Σχεδιάστε μία καμπύλη αναφοράς με τις μετρήσεις χρησιμοποιώντας ειδικό λογισμικό πακέτο ικανό να δώσει γραφική παράσταση με επεξεργασία 4 παραμέτρων. Εναλλακτικά, σχεδιάστε την καμπύλη αναφοράς τοποθετώντας το μέσο όρο των απορροφήσεων κάθε γνωστού δείγματος στον άξονα των x και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους στον άξονα των y και χαράξτε την καλύτερη καμπύλη που διέρχεται από τα σημεία (x,y) της γραφικής παράστασης. Η καμπύλη μπορεί να γίνει γραμμική αν χαραχθεί σε άξονα log συγκέντρωσης Ερο έναντι log οπτικής απορρόφησης και η βέλτιστη καμπύλη προσδιορίζεται από ανάλυση παλινδρόμησης (regression analysis). Η διαδικασία αυτή δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα με μικρότερη όμως ακρίβεια. Προσδιορίστε τις τιμές για κάθε άγνωστο δείγμα, αφού η τιμή του βρίσκεται μέσα στο εύρος τιμών (2,5-200 mlU/mL) της μεθόδου. Για άγνωστες τιμές δειγμάτων οι οποίες υπερβαίνουν το εύρος της μεθόδου, συμβουλευτείτε την παράγραφο **Αραίωση των Δειγμάτων Υψηλής Συγκέντρωσης σε Ερο.**

Τις τιμές των αγνώστων δειγμάτων που είναι μικρότερες από την περιοχή τιμών που προσδιορίζει η καμπύλη αναφοράς τις θεωρούμε μη ανιχνεύσιμες ή < 2,5 mlU/mL.

ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

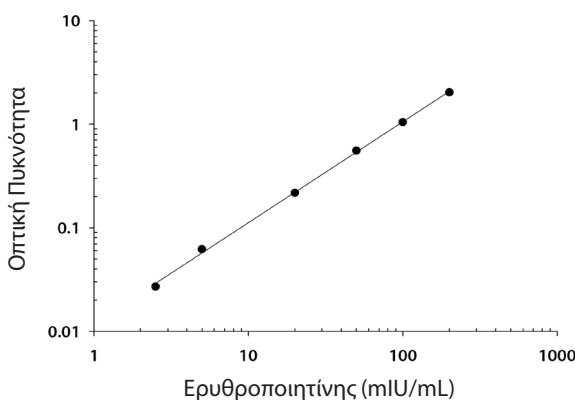
Οι παρακάτω καμπύλες αναφοράς είναι απλά ενδεικτικές, μόνο για επίδειξη. Νέα Καμπύλη αναφοράς πρέπει να σχεδιάζεται για κάθε ομάδα άγνωστων δειγμάτων που μετρώνται.

Πρωτόκολλο Πάγκου



(mlU/mL)	O.D.	Avg.	Διόρθωση
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

Πρωτόκολλο Ανακινήτηρος



(mlU/mL)	O.D.	Avg.	Διόρθωση
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

ΑΡΑΙΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΕ ΕΡΟ

Αν το ένα δείγμα ορού ή πλάσματος είναι πάνω από 200 mIU/mL αραιώστε το με Διαλύτη Δείγματος. Για παράδειγμα:

- Για δείγματα με συγκέντρωση σε Ερο μεταξύ 200 mIU/mL και 2000 mIU/mL, είναι απαραίτητη μία αραιώση 1:10. Αραιώστε 25 μ L δείγματος σε 225 μ L Διαλύτη Δείγματος.
- Για δείγματα με συγκέντρωση σε Ερο μεγαλύτερη από 2000 mIU/mL απαιτείται μεγαλύτερη αραιώση ώστε οι τιμές τους να είναι μέσα στο εύρος των τιμών της καμπύλης αναφοράς. (π.χ. αραιώσεις 1:20, 1:40, κ.λ.π.).

Σημείωση: Για την αραιώση των δειγμάτων χρησιμοποιείτε φιαλίδια πολυπροπυλενίου ή υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλενίου (HDPE). **ΜΗ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΕ ΓΥΑΛΙΝΑ ΦΙΑΛΙΔΙΑ.** Η χρήση γυάλινων φιαλιδίων θα δώσει εσφαλμένα αποτελέσματα εξαιτίας της απορρόφησης της Ερο στο γυαλί.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της Ερο σε δείγματα ορού ή πλάσματος πολλαπλασιάστε τα αποτελέσματα με τον συντελεστή αραιώσης.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Κάθε εργαστήριο που πραγματοποιεί αυτόν τον έλεγχο πρέπει να καθιερώσει ένα πρόγραμμα ποιοτικού ελέγχου με σκοπό τη παρακολούθηση της λειτουργίας του Quantikine IVD Ερο Immunoassay . Γι αυτό το λόγο σε κάθε δοκιμασία πρέπει να περιλαμβάνονται δείγματα με γνωστή συγκέντρωση (διατίθενται από την R&D Systems). Η R&D Systems συνιστά να μετρώνται τουλάχιστον δύο δείγματα ελέγχου κάθε φορά, ώστε να επιβεβαιώνουν τη σωστή εκτέλεση της μεθόδου .Ένα δείγμα ελέγχου με συγκέντρωση άνω του ημίσεως του φυσιολογικού εύρους τιμών και ένα δείγμα ελέγχου στο μέσον του εύρους τιμών της μεθόδου είναι μία καλή επιλογή για μια καθημερινή αξιολόγηση της λειτουργίας της μεθόδου. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ένα δείγμα ελέγχου στο μέγιστο σημείο του εύρους τιμών της μεθόδου ώστε να αξιολογούνται τα αποτελέσματα της μεθόδου για τα δείγματα με υψηλές τιμές. Αν οι τιμές των δειγμάτων ελέγχου που θα πάρουμε δεν είναι μέσα στο προκαθορισμένο εύρος τιμών, τα αποτελέσματα της μεθόδου μπορεί να είναι αβάσιμα.

Τα αποτελέσματα μίας συγκεκριμένης διαδικασίας είναι βάσιμα αν οι τιμές των δειγμάτων ελέγχου είναι μέσα στα δημοσιευμένα πεδία τιμών ενός δείγματος ελέγχου του εμπορίου ή μέσα στο εύρος τιμών που έχει καθοριστεί από ένα in-house παρασκευασμένο δείγμα ελέγχου. Ο συντελεστής συσχέτισης της καμπύλης αναφοράς πρέπει να είναι $\geq 0,95$.

ΟΔΗΓΙΕΣ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ

Γενικά, η αποτυχία της μεθόδου οφείλεται σε τεχνικά λάθη, κακή λειτουργία των μηχανημάτων ή στα αντιδραστήρια. Όταν αποτύχει μία διαδικασία, ελέγξτε την ημερομηνία λήξης του κάθε αντιδραστηρίου ξεχωριστά και βεβαιωθείτε ότι τα αντιδραστήρια έχουν αποθηκευτεί και φυλαχτεί όπως επισημαίνεται στην ετικέτα του αντιδραστηρίου. Επιπλέον, συμβουλευτείτε την Παράγραφο Επισημάνσεις για την αστάθεια ή την Αποικοδόμηση των Αντιδραστηρίων. Για περισσότερες πληροφορίες εάν η λειτουργία της μεθόδου είναι αμφισβητούμενη ή εάν δημιουργηθεί κάποιο πρόβλημα κατά την εκτέλεση της μεθόδου ίσως καταφέρετε να επισημάνετε το πρόβλημα με την βοήθεια του παρακάτω πίνακα:

ΠΡΟΒΛΗΜΑ	ΠΙΘΑΝΗ ΑΙΤΙΑ	ΕΛΕΓΧΟΣ Η ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ
Υψηλό %C.V.s (μεγάλη απόκλιση των επαναλήψεων συγκριτικά με τις συγκεκριμένες απαιτήσεις ακρίβειας του εργαστηρίου)	Ανεπαρκής έκπλυση των πηγαδιών	Βεβαιωθείτε ότι ο σταθμός έκπλυσης λειτουργεί κανονικά.
	Ανεπαρκής αναρρόφηση των πηγαδιών	Τα πηγαδάκια πρέπει να φαίνονται στεγνά μετά την αναρρόφηση
	Ατελής ανάμιξη του Πάγκου αντιδραστηρίου A και του Πάγκου αντιδραστηρίου B	Βεβαιωθείτε ότι το τελικό Διάλυμα Υποστρώματος είναι ικανοποιητικά αναμειγμένο
	Εκτόπισμα του περιεχομένου των πηγαδιών στο κάλυμμα της μικροπλάκας, λόγω του ανακινήτηρα	Βαθμονόμηση του ανακινήτηρα στα 500 ± 50 rpm
	Άνισοι όγκοι προστέθηκαν στα πηγαδάκια	Βεβαιωθείτε ότι οι πιπέτες είναι βαθμονομημένες και δουλεύουν σωστά
Χαμηλές τιμές (<0,015 O.D.) ή υψηλές τιμές υπόβαθρου (background)	Ανεπαρκής έκπλυση των πηγαδιών	Βεβαιωθείτε ότι ο σταθμός έκπλυσης λειτουργεί κανονικά
	Ανεπαρκής αναρρόφηση των πηγαδιών	Τα πηγαδάκια πρέπει να φαίνονται στεγνά μετά την αναρρόφηση
	Άνισοι όγκοι προστέθηκαν στα πηγαδάκια	Βεβαιωθείτε ότι οι πιπέτες είναι βαθμονομημένες και δουλεύουν σωστά
	Το αντιδραστήριο χρώματος A και το αντιδραστήριο χρώματος B αναμείχθηκαν πολύ νωρίς	Το τελικό διάλυμα Υποστρώματος πρέπει να χρησιμοποιηθεί μέσα σε 15 λεπτά από την παρασκευή του
Χαμηλός συντελεστής συσχέτισης της Καμπύλης Αναφοράς ($r < 0,95$)	Εσφαλμένη διανομή δειγμάτων	Χρησιμοποιείστε ξεχωριστά τα αποτελέσματα κάθε δοκιμής/εφαρμογής
Ανεπαρκής ανάπτυξη χρώματος	Ανεπαρκής αναρρόφηση των πηγαδιών	Τα πηγαδάκια πρέπει να φαίνονται στεγνά μετά την αναρρόφηση
	Άνισοι όγκοι προστέθηκαν στα πηγαδάκια	Βεβαιωθείτε ότι οι πιπέτες είναι βαθμονομημένες και δουλεύουν σωστά
	Λάθος χρόνος ή θερμοκρασία επώασης	Εμμένω στους ενδεδειγμένους χρόνους και θερμοκρασίες επώασης
	Αποτυχία του conjugate ή του αντιδραστήριου για το χρώμα	Αναμίξτε ίσους όγκους (π.χ 100 μL από το καθένα) αντιδραστήριο χρώματος A, αντιδραστήριο χρώματος B και Σύμπλεγμα Ερο. Πρέπει αμέσως να αναπτυχθεί χρώμα
Εκτόπισμα του περιεχομένου των πηγαδιών στο κάλυμμα	Η ρύθμιση των rpm στον ανακινήτηρα είναι πολύ υψηλή	Βαθμονόμηση του ανακινήτηρα στα 500 ± 50 rpm

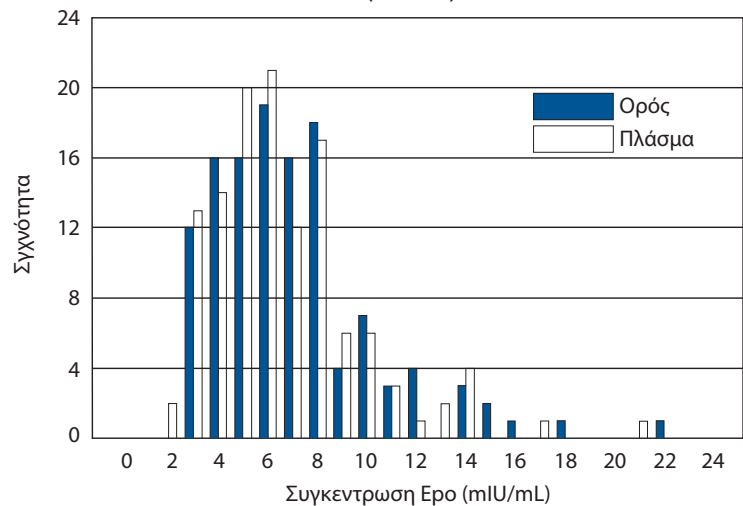
Φυσιολογικό εύρος

Το φυσιολογικό εύρος για ορό και πλάσμα σε EDTA καθορίστηκε με τη χρήση της ανάλυσης Quantikine IVD EPO ELISA. Οι συγκεντρώσεις ερυθροποιητίνης λήφθηκαν από 123 υγιή άτομα από την περιοχή Minneapolis/St. Paul, Minnesota. Με τη χρήση της μη παραμετρικής μεθόδου για την ανάλυση των τιμών αναφοράς οι οποίες παρατίθενται στο εγχειρίδιο "How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory" (NCCLS Document C28-P, Vol. 12, No. 2), καθορίστηκαν τα παρακάτω πεδία τιμών αναφοράς (2,5-97,5 εκατοστημόριο) για EPO στον ορό και σε πλάσμα σε EDTA. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να προσδιορίζει το δικό του φυσιολογικό εύρος.

Φυσιολογικά πεδία τιμών EPO

Ορός	Πλάσμα σε EDTA
3,3-16,6 mIU/mL	3,1-14,9 mIU/mL

Κατανομή Συγκεντρώσεων Της EPO
(n=123)



Εύρος σχετιζόμενο με τη νόσο

Οι ασθενείς με αληθή πολυκυτταραιμία ενδέχεται να έχουν συγκεντρώσεις EPO εντός του φυσιολογικού εύρους, ενώ όσοι πάσχουν από δευτεροπαθή πολυκυτταραιμία ενδέχεται να έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις EPO ορού. Οι ασθενείς με αληθή πολυκυτταραιμία οι οποίοι υποβάλλονται σε φλεβοτομή ενδέχεται να έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις EPO ορού.

Οι ασθενείς που πάσχουν από αναιμία (των περισσότερων τύπων) θα έχουν υψηλότερες από τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις EPO ορού, ενώ εκείνοι που πάσχουν από αναιμία συσχετιζόμενη με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια ενδέχεται να έχουν συγκεντρώσεις EPO ορού εντός του φυσιολογικού εύρους αυτής της ανάλυσης. Αναιμικοί ασθενείς οι οποίοι υποβάλλονται σε μεταγγίσεις ενδέχεται να έχουν χαμηλότερες από τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις EPO ορού.

Αφύσικα υψηλές συγκεντρώσεις EPO ορού μπορεί επίσης να παρατηρηθούν σε διάφορες άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι τα νεοπλάσματα των νεφρών, οι καλοήθεις όγκοι, οι πολυκυστικοί νεφροί, οι κύστεις των νεφρών και η υδρονέφρωση.

Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με πληροφορίες από κλινικές εκτιμήσεις και άλλες διαγνωστικές διαδικασίες.