

Quantikine® IVD® ELISA

Test absorpcji immunozależnej na ludzką Epo

Oznaczenie katalogowe DEP00

Ta ulotka załączona do zestawu musi być przeczytana w całości przed użyciem produktu. Charakterystyka testu i bibliografia znajdują się w angielskiej wersji tego protokołu.



IVD PRZY UŻYCIU DIAGNOSTYCZNYM IN VITRO

PRODUKCJA I DYSTRYBUCJA:

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 **DYSTRYBUCJA:**

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

SPIS TREŚCI

ROZDZIAŁ	STRONA
ZAŁĄCZONE ODCZYNNIKI.....	2
PRZECHOWYWANIE	2
OSTRZEŻENIA/ŚRODKI OSTROŻNOŚCI	3
CECHY WSKAZUJĄCE NA NIESTABILNOŚĆ LUB SPADEK JAKOŚCI	3
POZOSTAŁY WYMAGANY SPRZĘT LABORATORYJNY.....	4
PRZYRZĄDY	4
OGRANICZENIA.....	4
ZBIERANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK	5
PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW	5
PROCEDURA TESTOWA	6
UKŁAD ELEMENTÓW NA MIKROPŁYTCE	7
OBLICZENIE WYNIKÓW	8
TYPOWE DANE	8
ROZCIEŃCZANIE PRÓBEK O WYSOKIM STĘŻENIU EPO	9
KONTROLA JAKOŚCI	9
TROUBLESHOOTING	10
PRZEWIDYWANE WARTOŚCI WYNIKOWE.....	11

NAZWA I PRZEWIDZIANE ZASTOSOWANIE

Test immunoabsorpcji enzymozależnej (ELISA) do ilościowego ustalania stężenia erytropoetyny (Epo) w ludzkiej surowicy i osoczu, jako pomoc w diagnozie anemii i policytēmii.

ZASADA TESTU




ELISA Quantikine IVD Epo oparta jest na metodzie "sandwich" ("kanapkowej") przy użyciu dwóch przeciwciał. Dołki płytki mikrotitracyjnej, opłaszczone przeciwciałem monoklinalnym (myszy) specyficznym względem Epo są inkubowane z próbką lub standardem. Erytropoetyna wiąże się z unieruchomionym przeciwciałem na płytce. Po usunięciu nadmiaru próbki lub standardu, dołki inkubowane są z przeciwciałem poliklonalnym anti-Epo (królika) sprzężonym z peroksydazą chrzanową. Podczas drugiej inkubacji sprzężenie przeciwciało-enzym wiąże się z unieruchomionym Epo. Nadmiar sprzężenia usuwany jest przez przemycie. Do dołków dodawany jest chromogen, który podlega utlenieniu w trakcie reakcji enzymatycznej, i powstaje zabarwiony na niebiesko związek kompleksowy. Reakcję zatrzymuje się przez dodanie kwasu, który zmienia barwę niebieską na żółtą.

Ilość wygenerowanej barwy jest wprost proporcjonalna do ilości sprzężenia związanego z kompleksem przeciwciał specyficznych Epo, którego ilość jest z kolei wprost proporcjonalna do ilości Epo w próbce lub standardzie. Mierzony jest stopień absorbancji tego kompleksu, i generowana jest krzywa zwykła wykreślona przez zestawienie wartości absorbancji względem stężenia standardów Epo. Stężenie Epo w nieznannej próbce określone jest przez porównanie optycznej gęstości próbki do uzyskanej krzywej zwykłej. Standardy używane w tym teście to rekombinowana ludzka Epo skalibrowana zgodnie ze standardem Second International Reference Preparation (67/343). Jest to forma ludzkiej erytropoetyny otrzymywanej z uryny.

ZAŁĄCZONE ODCZYNNIKI

SORB	Płytki mikrotitracyjna erytropoetyny (Element 890126) - 96-dołkowa poliestyrenowa mikro płytki (12 pasek po 8 dołek), opłaszczona monoklonalnym przeciwciałem pochodzącym od myszy, specyficznym względem rekombinowanej ludzkiej Epo.		
CONJ	Sprężenie erytropoetyny (Element 890127) - 21,5 mL przeciwciała poliklonalnego pochodzącego od królika, specyficznego względem rekombinowanej ludzkiej Epo, sprężonego z peroksydazą chrzanową ze środkiem konserwującym.		
CAL	0	Standard erytropoetyny 0.0 mIU/ml (Element 890128) - 2,1 mL buforowanego podłoża białkowego ze środkiem konserwującym.	
CAL	2.5	Standard erytropoetyny 2.5 mIU/ml (Element 890129) - 2,1 mL rekombinowanej ludzkiej Epo w buforowanym podłożu białkowym ze środkiem konserwującym.	
CAL	5	Standard erytropoetyny 5.0 mIU/ml (Element 890130) - 2,1 mL rekombinowanej ludzkiej Epo w buforowanym podłożu białkowym ze środkiem konserwującym.	
CAL	20	Standard erytropoetyny 20.0 mIU/ml (Element 890131) - 2,1 mL rekombinowanej ludzkiej Epo w buforowanym podłożu białkowym ze środkiem konserwującym.	
CAL	50	Standard erytropoetyny 50.0 mIU/ml (Element 890132) - 2,1 mL rekombinowanej ludzkiej Epo w buforowanym podłożu białkowym ze środkiem konserwującym.	
CAL	100	Standard erytropoetyny 100.0 mIU/ml (Element 890133) - 2,1 mL rekombinowanej ludzkiej Epo w buforowanym podłożu białkowym ze środkiem konserwującym.	
CAL	200	Standard erytropoetyny 200.0 mIU/ml (Element 890134) - 2,1 mL rekombinowanej ludzkiej Epo w buforowanym podłożu białkowym ze środkiem konserwującym.	
DIL	AS	Rozcieńczalnik Testu Erytropoetyny (Element 895057) - 11 mL buforowanego podłoża białkowego ze środkiem konserwującym. Zawiera azydek sodu.	
DIL	SPE	Rozcieńczalnik próbek (Element 895058) - 26 ml bufora stabilizowanego białkiem ze środkiem konserwującym.	
BUF	WASH	25X	Koncentrat Bufora Myjącego Erytropoetyny (Element 895059) - 100 mL 25-krotnego koncentratu ze środkiem konserwującym.
SUBS	A	Odczynnik Koloru A (Element 895549) - 12 mL Odczynnika koloru A (0,01 N buforowanego nadtlenu wodoru).	
SUBS	B	Odczynnik Koloru B (Element 895550) - 12 mL Odczynnika Koloru B (0,35 g/L tetrametylobenzodyna).	
SOLN	STOP	Roztwór blokujący (Element 895060) - 11 mL kwasu siarkowego (2N). Uwaga: Środek żrący. Założyć okrycie ochronne na oczy, ręce, twarz i ubranie.	
Przykrycie płytek - 4 paski samoprzylepne.			

PRZECHOWYWANIE

Nie otwarty komplet	Nienaruszony zestaw przechowywać w temp. 2-8° C. Nie używać zestawu po upływie okresu przydatności.		 2°C - 8°C
Otwarte/Rozcieńczone odczynniki	Rozcieńczony bufor myjący	Mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej (20-25° C) do momentu upływu okresu przydatności.	 20°C - 25°C
	Roztwór blokujący	Może być przechowywany w temp. 2-8° C do momentu upływu okresu przydatności.	 2°C - 8°C
	Rozcieńczalnik próbek		
	Rozcieńczalnik testowy		
	Sprężenie		
	Czysty Odczynnik Koloru A		
	Czysty Odczynnik Koloru B		
	Standardy		
Płytki mikrotitracyjne z dołkami	Nie użyte płytki włożyć do torebki foliowej zawierającej środek osuszający, i zamknąć dokładnie zamknięcie strunowe torebki. Mogą być przechowywane w temp. 2-8° C do momentu upływu okresu przydatności.		

OSTRZEŻENIA/ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Przy użyciu diagnostycznym in vitro

- Nie używać zestawu po upływie okresu przydatności
- Aby osiągnąć najlepsze wyniki, każde laboratorium powinno uznać za obowiązującą określoną metodę testową (stacjonarną lub wytrząsarką) i wykonywać wszystkie testy tylko tą metodą.
- Aby zminimalizować zróżnicowanie w obrębie testu, pipetować próbę przez 15 minut.
- Nie zastępować odczynników z zestawu odczynnikami z innych kompletów lub innych źródeł.
- Chronić odczynniki zestawu przed silnym światłem podczas przechowywania i inkubacji.
- Chronić odczynniki z zestawu przed kontaktem z czynnikami utleniającymi i metalami.
- Wystawienie na działanie azydku sodu dezaktywuje sprzężenie.
- Nie pipetować ustami.
- Nie palić i nie spożywać pokarmów w miejscach gdzie operuje się odczynnikami z zestawu lub próbkami.
- Chronić skórę i błony śluzowe przed kontaktem z odczynnikami lub próbkami.
- Jeśli jakkolwiek odczynnik wejdzie w kontakt z oczami, skórą lub błonami śluzowymi, przemyć dużą ilością wody i skontaktować się z lekarzem.
- Surowica i wszystkie materiały wchodzące z nią w kontakt powinny być traktowane zgodnie ze wskazówkami CLSI dotyczącymi zapobieganiu przenoszeniu patogenów zawartych w krwi podczas prac laboratoryjnych.
- Czasy inkubacji i temperatury inne od wyszczególnionych mogą prowadzić do uzyskania błędnych wyników.
- Skażenie odczynników zestawu może prowadzić do uzyskania błędnych wyników.
- Jeśli to możliwe, stosować plastikowe pipety jednorazowe, końcówki pipet i naczynia do przygotowania i przechowywania odczynników. Szkło laboratoryjne winno być dokładnie przepłukane roztworem kwasu siarkowego (1N) lub kwasu solnego (1N) a następnie przemyte co najmniej trzykrotnie wodą dejonizowaną. Na szkle nie powinno być żadnych pozostałości kwasu lub detergentu.
- Do rozcieńczania próbek używać probówek z polipropylenu lub polietylenu o dużej gęstości (HDPE). **NIE UŻYWAĆ PROBÓWEK SZKLANYCH.**
- Niektóre z elementów tego zestawu zawierają azydki sodu, który może wchodzić w reakcje z ołowianą lub miedzianą instalacją wodno-kanalizacyjną, prowadząc do powstania wybuchowych azydów metali. Pozbywając się tych substancji, splukiwać dużymi ilościami wody.

CECHY WSKAZUJĄCE NA NIESTABILNOŚĆ LUB SPADEK JAKOŚCI

Odczynniki koloru powinny pozostać bezbarwne w postaci czystej i połączonej. Strąt w roztworach odczynników ogólnie uważany jest za cechę wskazującą na niestabilność lub spadek jakości. Jeśli jakiegokolwiek z tych oznak niestabilności lub spadku jakości zostaną zaobserwowane, lub gdy współczynnik korelacji krzywej zwykłej wynosi mniej niż 0,95, prosimy o zachowanie odczynników/ów w temp. 2-8° C i kontakt z R&D Systems Europe pod numerem +44 (0)1235 529449.

POZOSTAŁY WYMAGANY SPRZĘT LABORATORYJNY

- Pipety i końcówki pipet.
- Pozioma orbitalna wytrząsarka do mikropłytek (wychylenie 0,12") zdolną do utrzymywania częstotliwości 500 ± 50 obr/min (zgodnie z wymogami Metody z Wytrząsarką).
- 100 mL i 4-litrowe menzurki ze skalą.
- Pipeta wielokanałowa, dozownik butelkowy, dozownik wielokrotny, lub zautomatyzowana. płuczka mikropłytek.
- Bibuła absorbcyjna lub papierowe ręczniki do osuszania dołków.
- Czytnik mikropłytek zdolny do mierzenia absorbancji przy długości fali 450 nm, z długością fali korekcyjnej 600 nm.
- Tacki do odczynników immunoabsorpcyjnych.
- Woda dejonizowana lub destylowana.
- Komputer z możliwością 4-parametrowego pasowania krzywej logistycznej do redukcji danych.
- Próbka/i kontrolne Erythropoietin Serum Control, np. , Quantikine IVD Human Serum Control 1 i 2, oraz Control 3 [dostępne w R&D Systems, odpowiednio: nr katalogowy CEP01 (5 fiolek na każdy poziom) i nr katalogowy CEP03 (10 fiolek, poziom 3),] lub odpowiedniki.

PRYZRĄDY

Wyniki testu mierzone są spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm przy użyciu czytnika mikropłytek. Dla uzyskania najlepszych rezultatów, należy podczas pomiaru stosować falę referencyjną o długości 600 nm (długości fal 540 nm, 570 nm, i 650 nm mogą również być użyte) aby skorygować optyczne wady polistyrenowej mikropłytki. Można użyć przyrządów bez filtrów referencyjnych, niemniej precyzja wykonania testu może zostać zmniejszona. Polecane jest zastosowanie czytnika mikropłytek z zakresem gęstości optycznej $0-3 D \pm 0,005 D$. Czytniki mikropłytek z zakresem gęstości optycznej poniżej $0-3 D$ mogą również być użyte, ale zakres analizy może być zredukowany.

OGRANICZENIA

- Rezultaty testu powinny znaleźć zastosowanie w połączeniu z danymi pochodzącymi z badań klinicznych i innych procedur diagnostycznych. Nie przeprowadzono badań żadnych leków na możliwość ingerencji w test.
- Jeśli wartości uzyskane na podstawie próbek są wyższe niż najwyższy standard, próbki należy rozcieńczyć w Rozcieńczalniku Próbek i test powtórzyć. Zmiana operatora/badacza, techniki pipetowania, techniki mycia, czasu inkubacji lub temperatury i wieku zestawu mogą spowodować zróżnicowanie w wiązaniu substancji.

ZBIERANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK

Surowica - Używać separatora surowicy lub probówki na skrzep, i pozwolić próbkom na koagulację w temperaturze pokojowej (20-25° C). Wirować przy 760 x g* przez 15 minut w temperaturze pokojowej, w przeciągu 30 min. od pobrania, aby uniknąć hemolizy. Rozdzielić w równych ilościach i przechowywać w temp. 2-8° C do 7 dni, lub przez czas nieokreślony w temp. -10° C w zamrażarce bez autorozmrażania. **Unikać powtarzanych cykli zamrażania-rozmrażania.**

Osocze - Zbierać osocze używając EDTA (kwasu wersenowego) jako antykoagulantu. Wirować próbki przy 760 x g* przez 15 minut w temperaturze pokojowej w przeciągu 30 minut od pobrania. Rozdzielić na probówki i przechowywać w temp. 2-8° C do 7 dni, lub przez czas nieokreślony w temp. -10° C w zamrażarce bez autorozmrażania. **Unikać powtarzanych cykli zamrażania-rozmrażania.**

Zaleca się, aby każde laboratorium ustandaryzowało test używając próbek albo surowicy, albo skoagulowanego EDTA osocza.

Lipemiczne, uległe w wysokim stopniu hemolizie lub skażone próbki mogą prowadzić do uzyskania niedokładnych wyników, i nie powinny być testowane za pomocą niniejszej procedury. Nie przeprowadzono również badań żadnych leków, które mogłyby rzutować na test. Patrz Wytyczne CLSI: *Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens* (Procedury posługiwania się i przetwarzania próbek krwi) (Dokument CLSI H18; Aktualna wersja)

* $g = (1,118 \times 10^{-5}) (\text{promień w cm}) (\text{obr/min})^2$

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem, wszystkie odczynniki powinny być doprowadzone do temperatury pokojowej (20-25° C).

Bufor Myjący (1X) - Jeśli w koncentracji uformowały się kryształki, podgrzać do temperatury pokojowej i mieszać delikatnie aż do całkowitego rozpuszczenia kryształków. Rozcieńczyć 100 mL Koncentratu Bufora Myjącego w 2500 mL wody dejonizowanej lub destylowanej aby uzyskać 2500 mL Bufora Myjącego (1X).

Roztwór Substratu - Odczynniki Koloru A i B powinny zostać zmieszane w równych objętościach 15 minut przed użyciem. Chronić przed światłem. 200 µL uzyskanej mieszanki przypada na jeden dołek. Pozbyć się przygotowanego Roztworu Substratu jeśli nie został użyty.

PRZYGOTOWANIE ROZTWORU SUBSTRATU WZGLĘDEM ROZMIARU TESTU		
Całkowita liczba dołków na próby	Objętość Odczynnika Koloru A	Objętość Odczynnika Koloru B
96	11 mL	11 mL
48	6 mL	6 mL
32	4 mL	4 mL

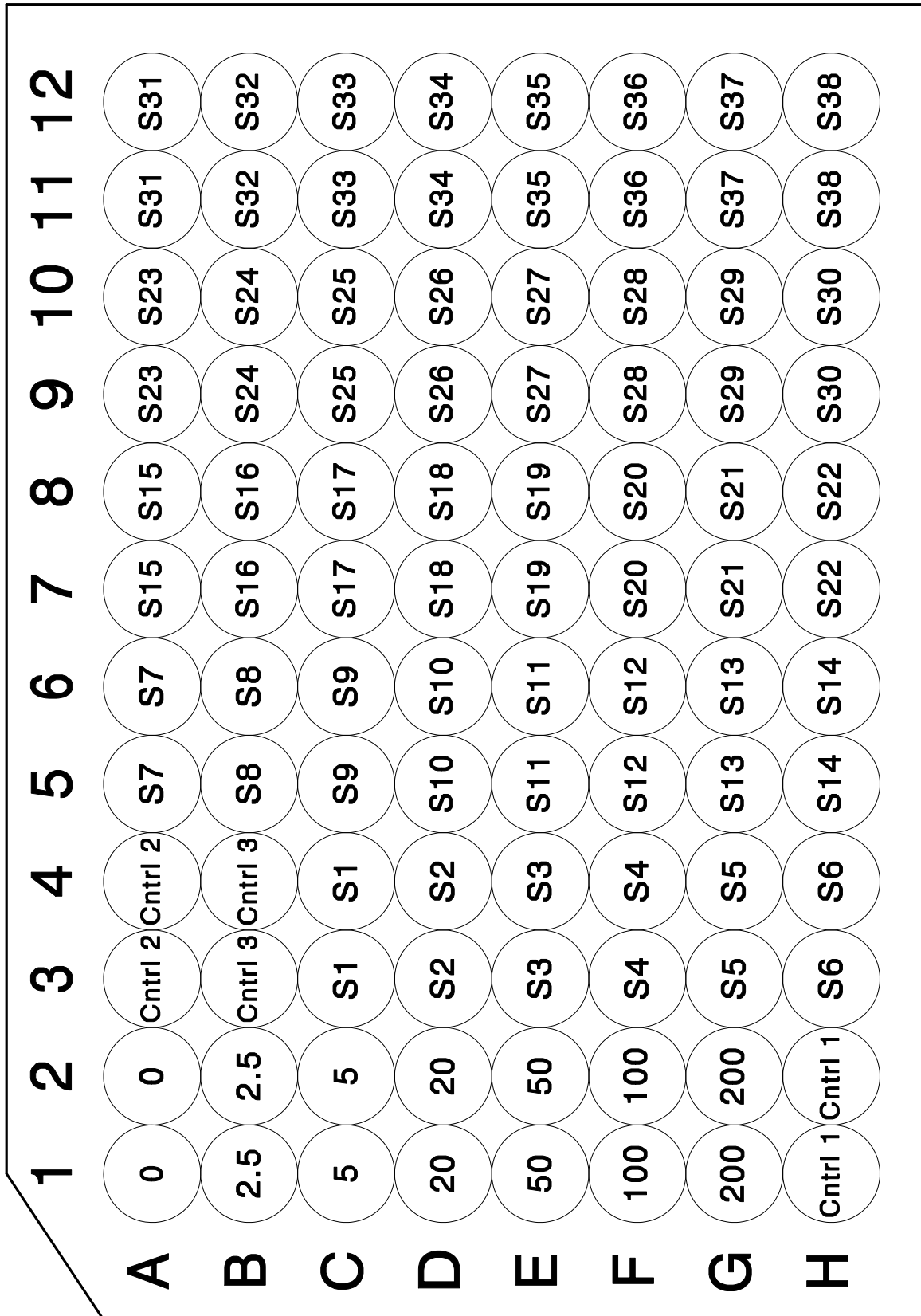
PROCEDURA TESTOWA

Zanim zostaną użyte, wszystkie odczynniki i próbki powinny być doprowadzone do temperatury pokojowej. (20-25° C). Zaleca się aby wszystkie próbki, standardy i kontrole były testowane w duplikatach. Zasady metody stacjonarnej (na stole laboratoryjnym) i wykorzystującej wytrząsarkę zostały załączone. W trakcie całego testu należy stosować tą samą metodę.

1. Przygotować odczynniki według wskazówek w poprzedniej sekcji.
2. Usunąć pokrywającą folię uszczelniającą, i włożyć ją z powrotem do torebki plastikowej z zamkiem strunowym zawierającym środek odsuszający, zamknąć dokładnie.
3. W każdy dołek wprowadzić pipetą 100 μ L Rozcieńczalnika Testowego Epo.
4. Dodać 100 μ L standardu, kontroli i próbki na dołek. Delikatnie stukać w ramę płytki przez ok. 1 min aby dokładnie wymieszać zawartość. Przykryć płytkę załączonym paskiem samoprzylepnym. Układ elementów na płytce zawierający przykładowy schemat rozmieszczenia standardów, kontroli i próbek znajduje się na str. 80.
Dla Metody Stacjonarnej: Inkubować przez 2h \pm 5 w temperaturze pokojowej.
Dla Metody z Wytrząsarką: Inkubować przez 1 h \pm 5 w temperaturze pokojowej na poziomej orbitalnej wytrząsarce (wychylenie 0,12") przy 500 \pm 50 obr/min.
5. Dokładnie pobrać odsysając lub dekantować zawartość każdego dołka. Odsuszyć na czystym papierowym ręczniku. **Nie myć.**
6. Dodać 200 μ L Sprzężenia Epo do każdego dołka. Przykryć płytkę nowym paskiem samoprzylepnym.
Dla Metody Stacjonarnej: Inkubować przez 2h \pm 5 w temperaturze pokojowej.
Dla Metody z Wytrząsarką: Inkubować przez 1 h \pm 5 w temperaturze pokojowej na poziomej orbitalnej wytrząsarce.
7. Odessać dokładnie każdy dołek i umyć, powtarzając jeszcze trzykrotnie, myjąc w sumie czterokrotnie. Myć napełniając każdy dołek Buforem Myjącym (400 μ L) używając dozownika butelkowego, dozownika wielokrotnego lub płuczki do mikroplatek. Każdorazowe całkowite usunięcie płynu jest niezmiernie istotne dla zachowania właściwych parametrów wydajności. Po ostatnim myciu, pozostałości Bufora Myjącego odsysając lub dekantując. Odwrócić płytkę do góry dnem i osuszyć na czystych ręcznikach papierowych.
8. Dodać 200 μ L Roztworu Substratu do każdego dołka. (**Uwaga:** Roztwór Substratu **musi** zostać użyty w przeciągu 15 minut od przygotowania). Inkubować przez 20-25 minut w temperaturze pokojowej **na stole laboratoryjnym.**
9. Dodać 100 μ L Roztworu Blokującego do każdego dołka. Jeśli zmiana koloru nie wygląda na jednolitą, lekko postukać płytkę aby zawartość została dokładnie wymieszana.
10. Określić gęstość optyczną (D) każdego dołka w przeciągu 15 minut, przy użyciu czytnika mikroplatek ustawionego na 450 nm. Jeśli dostępna jest fala korekcyjna, ustawić jej długość na 600 nm. Jeśli zaś długość fali korekcyjnej jest niedostępna, odjąć wartości odczytu przy 600nm od wartości uzyskanych przy 450 nm. Odejmowanie to pozwoli na skorygowanie błędnego odczytu wynikającego z optycznych wad płytki. Odczyty uzyskane bezpośrednio przy 450 nm bez korekty mogą być wyższe i mniej dokładne.

UKŁAD ELEMENTÓW NA MIKROPŁYTCE

Poniżej znajduje się przykładowy schemat rozmieszczenia standardów, kontroli i próbek.



OBLICZENIE WYNIKÓW

Odczytać wartość absorbancji z każdego dołka w czytniku mikroplótek, używając 450 nm jako pierwotnej długości fali 600 nm jako długości fali referencyjnej. (540, 570 i 650 nm są dopuszczalne)
Obliczyć średnią zduplikowanych odczytów dla każdego standardu, kontroli i próbki, i odjąć średnią 0 mIU/ml gęstości optycznej standardu.

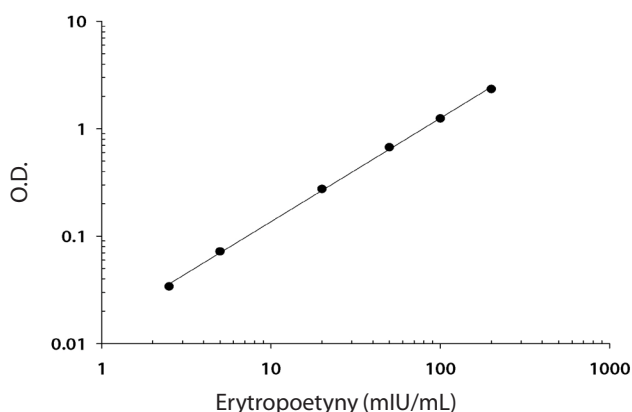
Stworzyć krzywą zwykłą przez redukcję danych używając oprogramowania zdolnego do wygenerowania 4-parametrowego (4PL) pasowania krzywej logistycznej. Alternatywnym rozwiązaniem jest zbudowanie krzywej zwykłej przez naniesienie średnich wartości absorbancji dla każdego standardu na osi y względem stężenia na osi x i wykreślenie najlepiej dopasowanej krzywej wzdłuż punktów na wykresie. Przekształcenia danych w formę linearną można dokonać przez naniesienie logu stężeń Epo względem logu gęstości optycznej (D), i najlepiej dopasowana linia może zostać określona przez analizę regresji. Procedura ta pozwoli uzyskać odpowiednie, lecz mniej precyzyjne dopasowanie danych.

Zgłaszać wartości dla każdej niewiadomej przy odczycie w przedziale (2,5-200 mIU/ml) testu. Dla wartości niewiadomych powyżej zakresu, patrz sekcja Rozcieńczanie Próbek o Wysokim Stężeniu Epo. Wartości poniżej podanego przedziału, zgłaszać jako niewykrywalne lub < 2,5 mIU/ml.

TYPOWE DANE

Te krzywe zwykłe zamieszczono wyłącznie w celach demonstracyjnych. Dla każdego testowanego zestawu próbek należy wykreślić krzywą zwykłą.

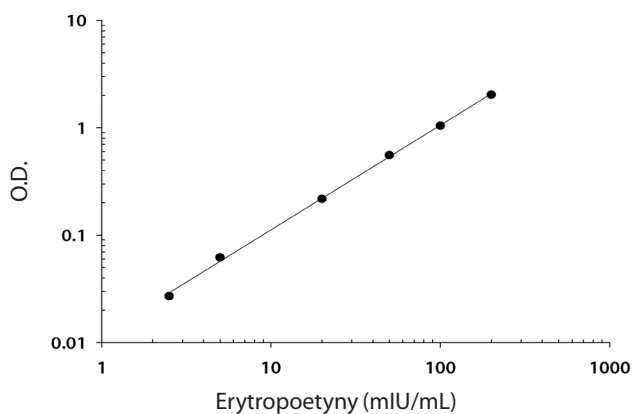
Metoda Stacjonarna



Metoda Stacjonarna

(mIU/mL)	O.D.	Średnia	Skorygowana
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

Metoda z Wytrząsarką



Metoda z Wytrząsarką

(mIU/mL)	O.D.	Średnia	Skorygowana
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

ROZCIEŃCZANIE PRÓBEK O WYSOKIM STĘŻENIU EPO

Próbkę surowicy lub osocza powyżej 200 mIU/mL należy rozcieńczyć Rozcieńczalnikiem Próbek.

Na przykład

- Dla próbek ze stężeniem Epo pomiędzy 200 mIU/mL a 2000 mIU/mL, wymagane jest 10-krotne rozcieńczenie. Rozcieńczyć 25 μ L próbki 225 μ L Rozcieńczalnika Próbek.
- Próbki ze stężeniem Epo powyżej 2000 mIU/mL winny być mocniej rozcieńczone, taka by zbliżyć je do zakresu krzywej zwykłej (np. 20-krotnie, 40-krotnie, itd.)

Uwaga: Do rozcieńczania próbek używać probówek z polipropylenu lub polietylenu o dużej gęstości (HDPE). **NIE UŻYWAĆ PROBÓWEK SZKLANYCH.** Zastosowanie probówek szklanych spowoduje uzyskanie błędnych wyników ze względu na adsorpcję Epo do szkła.

W celu określenia stężenia Epo w próbkach surowicy lub osocza, należy pomnożyć uzyskany wynik przez współczynnik rozcieńczenia.

KONTROLA JAKOŚCI

Każde laboratorium przeprowadzające analizę powinno ustalić program kontroli jakości, w celu monitorowania wyników testu immunoabsorpcyjnego Quantikine IVD Epo W ramach tego programu, próbki kontrolne ze znanymi stężeniami Epo (dostępne w R&D Systems) powinny znaleźć w każdym teście. R&D Systems zaleca użycie przynajmniej dwóch próbek kontrolnych w teście w celu weryfikacji dokładności metody testowej. Wprowadzenie próbki kontrolnej w środkowo-górnym przedziale końcowym normalnego zakresu i próbka kontrolna umieszczona w okolicy środka krzywej testowej to dobry wybór na codzienną ocenę dokładności testu. Można również umieścić próbkę kontrolną w górnym końcu krzywej testowej w celu oceny dokładności górnego krańca próby. Jeśli uzyskane wartości nie znajdują się w obrębie ustalonego przedziału, wyniki testu mogą być nieważne. Wyniki jednostkowego testu są ważne o ile uzyskane wartości kontrolne pozostają w obrębie opublikowanych przedziałów dostępnych komercyjnie próbek kontrolnych, lub ustalonego przedziału dla własnych próbek kontrolnych. Współczynnik korelacji pasowanej krzywej zwykłej powinien wynosić $\geq 0,95$.

TROUBLESHOOTING

Ogólnie rzecz ujmując, niepowodzenie testu wynika z błędu technicznego, awarii przyrządów lub problemów z odczytnikami. Kiedy test zawodzi, należy sprawdzić daty ważności odczytników i upewnić się, że wszystkie odczytniki były przechowywane zgodnie ze wskazówkami na oznakowaniu produktu. Dodatkowe informacje znajdują się w sekcji Cechy wskazujące na niestabilność lub spadek jakości. Jeśli dokładność testu budzi wątpliwości, lub też w trakcie przeprowadzania testu występują problemy, kwestie problematyczne można zidentyfikować posługując się poniższą tabelą.

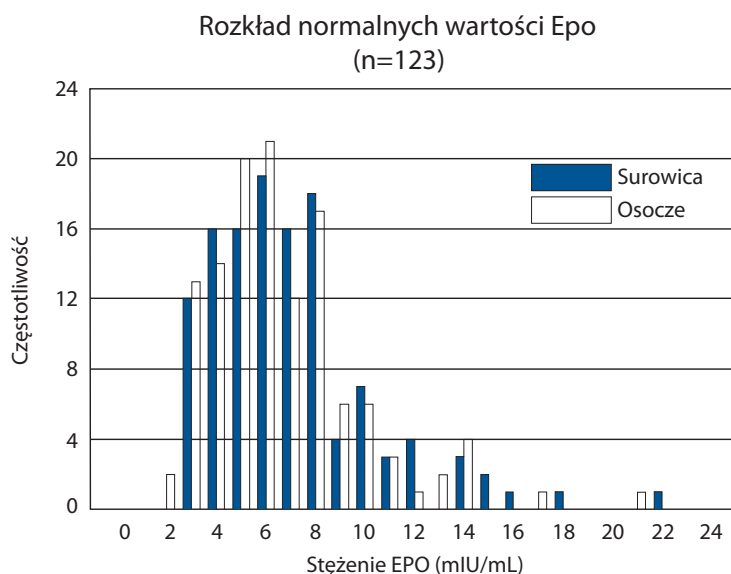
PROBLEM	MOŻLIWE ŹRÓDŁO	SPRAWDZENIE LUB DZIAŁANIE
Wysoki współczynnik wariancji (% C.V.) (duża zmienność duplikatów w porównaniu z wymogami dokładności poszczególnych laboratoriów)	Niedokładne wymycie dołków.	Upewnić się, że stacja myjąca działa prawidłowo
	Niedokładne odsysanie z dołków.	Dołki powinny wyglądać na suche po odsysaniu
	Niepełne zmieszanie Odczynnika Koloru A i Odczynnika Koloru B	Upewnić się, że Roztwór Substratu jest właściwie wymieszany
	Wytrząsarka rozlewa zawartość dołków na pokrywę płytki	Skalibrować wytrząsarkę do 500 ± 50 obr/min
	Nierówne objętości wprowadzone do dołków	Upewnić się, że pipeta jest skalibrowana i działa prawidłowo
Zredukowana niska gęstość optyczna ($< 0,015 D$) lub wysokie tło	Niedokładne wymycie dołków	Upewnić się, że stacja myjąca działa prawidłowo
	Niedokładne odsysanie z dołków	Dołki powinny wyglądać na suche po odsysaniu
	Nierówne objętości wprowadzone do dołków	Upewnić się, że pipeta jest skalibrowana i działa prawidłowo
	Odczynnik Koloru A i Odczynnik Koloru B zmieszane zbyt wcześnie	Roztwór Substratu musi zostać użyty w przeciągu 15 minut od przygotowania
Słaba korelacja Krzywej Zwykłej ($r < 0,95$)	Błąd pipetowania	Rozważyć edycję danych zgodnie z procedurami danego laboratorium.
Niedokładne powstawanie koloru	Niedokładne odsysanie z dołków	Dołki powinny wyglądać na suche po odsysaniu
	Nierówne objętości wprowadzone do dołków	Upewnić się, że pipeta jest skalibrowana i działa prawidłowo
	Niewłaściwe czasy inkubacji lub temperatury	Stosować się do zalecanych okresów inkubacji i temperatur
	Sprzężenia lub Odczynnik Koloru nie reaguje	Zmieszać równe objętości (tj.: $100 \mu\text{L}$ każda) Odczynnika Koloru A, Odczynnika Koloru B, i Sprzężenia Epo. Właściwe barwienie powinno nastąpić natychmiast
Wytrząsarka rozlewa zawartość dołków na przyklejaną pokrywę płytki	Zbyt szybkie obroty wytrząsarki płytek	Skalibrować wytrząsarkę do 500 ± 50 obr/min

PRZEWIDYWANE WARTOŚCI WYNIKOWE

Stężenia erytropoetyny pobrano od 123 normalnych osób z okolic Minneapolis/St. Paul w Minnesocie. Używając nieparametrycznej metody analizy wartości referencyjnych przedstawionej w publikacji NCCLS "How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory" ("Jak definiować, określać i stosować interwały referencyjne w laboratorium klinicznym", Dokument NCCLS C28-P; Vol. 12 No. 2), ustalono następujące przedziały referencyjne (2,5-97,5 percentyla) dla Epo w surowicy i skoagulowanym EDTA osoczu. Każde laboratorium testujące powinno ustalić swój własny normalny zakres.

Normalne Zakresy Epo

Surowica	Osocze EDTA
3,3-16,6 mIU/mL	3,1-14,9 mIU/mL



Pacjenci cierpiący na czerwienicę prawdziwą (polycythaemia rubra) mogą wykazywać stężenie Epo w obrębie normalnego zakresu, podczas gdy ci z polycytemią wtórną mogą mieć podwyższone stężenie Epo w surowicy. Chorujący na polycytemię rubra vera poddawani nacięciu żyły mogą mieć podwyższone stężenie Epo w surowicy.

Pacjenci cierpiący na większość typów anemii będą wykazywali wyższe niż normalne stężenie Epo w surowicy, podczas gdy chorujący na anemię związaną z przewlekłą niewydolnością nerek mogą wykazywać stężenie Epo w surowicy w obrębie normalnego przedziału tego testu. Cierpiący na niedokrwistość otrzymujący transfuzje mogą mieć stężenia Epo niższe niż przewidywane. Nienormalnie wysokie stężenia Epo w surowicy można również zaobserwować w różnych innych stanach patologicznych takich jak nowotwory nerek, nowotwory łagodne, choroba wielotorbielowa nerek, torbiel nerkowa i wodonercze.

Wyniki tego testu należy wykorzystywać w połączeniu z danymi uzyskanymi w badaniach klinicznych i innych procedurach diagnostycznych.