

Quantikine® IVD® ELISA

Human Epo Protocolo do imunoensaio Quantikine IVD

Número de catálogo DEP00

Este suplemento contém o protocolo do ensaio e deve ser lido na íntegra antes da utilização deste produto. Para características de performance e referências bibliográficas, bem como o protocolo em Inglês, por favor consulte o folheto informativo principal.



IVD PARA USO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO

 **PRODUZIDO E DISTRIBUIDO POR:**

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** **DISTRIBUIDO POR:**

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

INDICE

CONSTITUINTES

PÁGINA

REAGENTES FORNECIDOS	2
ARMAZENAMENTO.....	2
CUIDADOS/ PRECAUÇÕES.....	3
INDICAÇÕES DE INSTABILIDADE E DETERIORAÇÃO.....	3
OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS	4
INSTRUMENTOS	4
LIMITAÇÕES	4
COLHEITAS DE AMOSTRAS E ARMAZENAMENT.....	5
PREPARAÇÃO DOS REAGENTES.....	5
PROCEDIMENTO DO ENSAIO.....	6
LAYOUT DA PLACA	7
CÁLCULO DOS RESULTADOS	8
VALORES TÍPICOS.....	8
DILUIÇÃO DE AMOSTRAS COM ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE EPO	9
CONTROLO DE QUALIDADE.....	9
GUIÃO PARA A RESOLUÇÃO DE POSSÍVEIS PROBLEMAS	10
VALORES ESPERADOS.....	11

USO PRETENDIDO

Imunoensaio (ELISA) para a determinação quantitativa de concentrações de eritropoietina (Epo) em soro e plasma humano, como auxiliar no diagnóstico de anemia e policitemia.




PRINCÍPIO DO ENSAIO

O Quantikine IVD Epo ELISA é baseado no método sandwich de duplo-anticorpo. Os poços da microplaca, revestidos com um anticorpo monoclonal (murino) específico para Epo, são incubados com soro ou standard. A eritropoietina liga-se ao anticorpo imobilizado na placa. Após remover o excesso de soro ou standard, os poços são incubados com um anticorpo policlonal (coelho) conjugado com peroxidase de rábano. Durante a segunda incubação, o conjugado enzima-anticorpo liga-se à Epo imobilizada. O conjugado em excesso é removido por lavagem. Um cromogéneo é adicionado aos poços e é oxidado pela reacção enzimática formando um complexo da cor azul. A reacção é parada pela adição de ácido, que vai mudar o azul para amarelo. A quantidade da cor gerada é directamente proporcional à quantidade de conjugado ligado ao anticorpo Epo, que, por sua vez, é directamente proporcional à quantidade de Epo no soro ou no standard. A absorvância deste complexo é medida e faz-se uma curva standard da absorvância versus a concentração dos standards de Epo. A concentração de Epo das amostras é determinada pela extrapolação da densidade óptica da amostra na curva standard. Os standards usados neste ensaio são Epo humana recombinante calibrada segundo o “Second International Reference Preparation (67/343)”, uma forma derivada de eritropoietina de urina humana.

REAGENTES FORNECIDOS

SORB	Microplaca Eritropoetina (Part 890126) - microplaca de poliestireno de 96 poços (12 strips de 8 poços) revestida com um anticorpo monoclonal de ratinho contra Epo humano recombinante.		
CONJ	Conjugado para eritropoetina (Part 890127) - 1 frasco (21,5 mL) de anticorpo policlonal contra Epo humano recombinante, conjugado com peróxidase de rábano com conservante.		
CAL	0	Eritropoetina 0.0 mIU/mL Standard (Part 890128) - 1 frasco (2,1 mL) base proteica tamponada com conservante.	
CAL	2.5	Eritropoetina 2.5 mIU/mL Standard (Part 890129) - 1 frasco (2,1 mL) de Epo humano recombinante numa base proteica tamponada com conservante.	
CAL	5	Eritropoetina 5.0 mIU/mL Standard (Part 890130) - 1 frasco (2,1 mL) de Epo humano recombinante numa base proteica tamponada com conservante.	
CAL	20	Eritropoetina 20.0 mIU/mL Standard (Part 890131) - 1 frasco (2,1 mL) de Epo humano recombinante numa base proteica tamponada com conservante.	
CAL	50	Eritropoetina 50 0mIU/mL Standard (Part 890132) - 1 frasco (2,1 mL) de Epo humano recombinante numa base proteica tamponada com conservante.	
CAL	100	Eritropoetina 100.0 mIU/mL Standard (Part 890133) - 1 frasco (2,1 mL) de Epo humano recombinante numa base proteica tamponada com conservante.	
CAL	200	Eritropoetina 200.0 mIU/mL Standard (Part 890134) - 1 frasco (2,1 mL) de Epo humano recombinante numa base proteica tamponada com conservante.	
DIL	AS	Diluyente de Ensaio de Eritropoetina (Part 895057) - 1 frasco (11 mL) Diluyente de ensaio com conservante. Contém azida de sódio.	
DIL	SPE	Diluyente das Amostras (Part 895058) - 1 frasco (26 mL) de tampão de proteína estabilizada com conservante.	
BUF	WASH	25X	Tampão de Lavagem Concentrado (Part 895059) - 1 frasco (100 mL) de tampão concentrado 25 vezes com conservante.
SUBS	A	Reagente da Cor A (Part 895549) - 1 frasco (12 mL) Reagente da Cor A (0,01 N peróxido de hidrogénio tamponado).	
SUBS	B	Reagente da Cor B (Part 895550) - 1 frasco (12 mL) Reagente da Cor A (0,35 g/L tetrametilbenzidina)	
SOLN	STOP	Solução Stop (Part 895060) - 1 frasco (11 mL) de ácido sulfúrico 2N. Atenção: material corrosivo. Usar protecção para as mãos, olhos, face e vestuário de protecção.	
Cobertura para as placas - 4 películas adesivas.			

ARMAZENAMENTO

Kits não abertos	Guardar em 2-8° C. Não usar para além do prazo de validade do kit.		
Reagentes abertos/diluídos	Tampão de lavagem diluído	Pode ser guardado à temperatura ambiente (20-25° C) até ao fim do prazo de validade do kit.	
	Solução Stop	Podem ser guardados em 2-8° C até ao fim do prazo de validade do kit.	
	Diluyente das Amostras		
	Diluyente do Ensaio		
	Conjugado		
	Reagente da Cor A não misturada		
	Reagente da Cor B não misturada		
	Standards (0,0-200mIU/mL)		
Poços da Microplaca	Os poços não utilizados da microplaca devem ser repostos na bolsa que contém o dissecante, a qual deve ser re-selada ao longo do seu bordo do fecho zip. Pode ser guardada em 2-8° C até ao fim do prazo de validade do kit.		

CUIDADOS/ PRECAUÇÕES

Para uso em diagnósticos In Vitro

- Não use os reagentes do kit além da data de validade.
- Para melhores resultados, cada laboratório deve validar um método de laboratório específico (Bancada ou Protocolo de Agitação) e realizar todos os ensaios com esse método.
- De forma a minimizar as variações intra-ensaio, recomenda-se que o ensaio seja pipetado em 15 minutos.
- Não substituir os reagentes do kit com outros de diferentes lotes ou de outras fontes.
- Não expôr os reagentes do kit a luz forte durante armazenagem ou incubação.
- Evitar o contacto dos reagentes do kit com agentes oxidantes ou metal.
- Exposição a azida de sódio pode inactivar o conjugado.
- Não pipetar à boca.
- Não fumar ou comer nas áreas nos locais onde os kits ou amostras são manuseados.
- Evitar contacto da pele ou membranas mucosas com os reagentes do kit ou com as amostras.
- Se qualquer reagentes entrar em contacto com a pele ou olhos, lavar com água abundante e consultar um médico.
- Manusear todos os soros materiais em contacto com os soros de acordo com as directivas da CLSI para a prevenção de transmissão de patógenos sanguíneos durante os procedimentos no laboratório.
- Tempos e temperaturas de incubação diferentes dos especificados podem induzir a resultados erróneos.
- A contaminação dos reagentes do kit podem induzir a resultados erróneos.
- Se possível, usar pipetas de plástico descartáveis, pontas e contentores para a preparação e armazenamento dos reagentes. O material de vidro utilizado deve ser cuidadosamente lavado com ácido sulfúrico 1N ou com ácido hidrocloreico seguido de pelo menos três lavagens com água desionizada. Não devem permanecer nem ácidos nem detergente no material de vidro.
- Utilize tubos de ensaio de polipropileno ou de polietileno de alta densidade (HDPE) para a diluição das amostras. **NÃO USAR TUBOS DE VIDRO.**
- Alguns componentes neste kit contêm sódio azido que pode reagir com chumbo e cobre e formar azidos metálicos explosivos. Lavar com grandes volumes de água ao jogar fora.

INDICAÇÕES DE INSTABILIDADE E DETERIORAÇÃO

As Soluções Substrato devem ser incolores quando separadas ou combinadas. Precipitados nas soluções dos reagentes são geralmente considerados indicadores de instabilidade ou de deterioração. Se forem observadas algumas destas indicações de instabilidade ou de deterioração, ou se o coeficiente da correlação da curva standard é inferior a 0,95, retenha o(s) reagente(s) em questão a 2-8° C e contacte a R&D Systems Europe através dos seguintes números de telefone: +44 (0)1235 529449.

OUTROS MATERIAIS NECESSÁRIOS

- Pipetas e pontas para pipetas.
- Um agitador de microplacas horizontal orbital (órbita de 0,12") com capacidade de manter uma velocidade de 500 ± 50 rpm (necessário para o protocolo com agitação).
- Provetas/buretas graduadas a 100 mL e a 4L.
- Dispensador manual, garrafa de lavagem, ou lavador automático de microplacas.
- Base absorvente ou toalhas de papel para retirar o excedente das soluções nos poços das placas.
- Leitor de microplacas com capacidade de leitura a 450 nm, com correção de comprimento de onda a 600 nm.
- Tabuleiros para reagentes de imunoenaios.
- Água desionizada ou destilada.
- Recomenda-se a utilização de um computador com capacidade para uma curva de quatro parâmetros, para o tratamento dos dados.
- Controlo(s) soro eritropetina, por exemplo, Contolor Soro Humano Quantikine IVD 1, e 2, e Controlo 3 [disponível através da R&D Systems, No. Cat. CEP01 (5 frascos cada, nível 1 e 2) e No. Cat. CEP03 (10 frascos do nível 3), respectivamente] ou equivalente.

INSTRUMENTOS

Os resultados do ensaio são quantificados espectrofotometricamente a 450 nm, usando um leitor de microplaca. Para melhores resultados, uma leitura num comprimento de onda referencial a 600 nm (também podem ser usados 540 nm, 570 nm e 650 nm) deve ser incluída nas medidas para corrigir imperfeições ópticas na microplaca de poliestireno. Instrumentos sem filtros de referência também podem ser usados, mas a precisão do ensaio pode decrescer. Recomenda-se a utilização de um leitor de microplaca com uma densidade óptica variando entre 0-3 D.O. e uma precisão de $\pm 0,005$ D.O. Pode ser usado um leitor de microplaca com limite de densidade óptica inferior a 0-3 D.O. mas os limites do ensaio vão ser reduzidos.

LIMITAÇÕES

- Os resultados deste ensaio devem ser utilizados em conjunção com informação disponível a partir de avaliações clínicas e outros procedimentos diagnósticos.
- Não foram pesquisadas interferências de drogas no ensaio.
- Se as amostras obtiverem valores superiores ao standard mais elevado, devem ser Diluídas e o Ensaio repetido.
- Qualquer variação no operador, técnica de pipetagem, técnica de lavagem, tempo ou temperatura de incubação e antiguidade do kit podem causar variações nas ligações.

COLHEITAS DE AMOSTRAS E ARMAZENAMENT

Soro - Use um separador de soro ou um tubo de coágulo e permita que as amostras coagulem à temperatura ambiente (20-25° C). Centrifugue a 760 g* durante 15 minutos à temperatura ambiente num espaço de 30 minutos, para evitar a hemólise. Faça aliquotas e guarde em tubos estéreis a 2-8° C até 7 dias, ou a ≤-10° C num congelador sem descongelamento automático.

Evitar ciclos repetidos de congelamento/descongelamento.

Plasma - Fazer a colheita de plasma usando EDTA como anticoagulante. Centrifugue a 760 g* durante 15 minutos à temperatura ambiente num espaço de 30 minutos, para evitar a hemólise. Faça aliquotas e guarde em tubos estéreis a 2-8° C até 7 dias, ou a ≤-10° C num congelador sem descongelamento automático. **Evitar ciclos repetidos de congelamento/descongelamento.**

É recomendável que cada laboratório standardize o ensaio utilizando amostras de soro ou plasma com EDTA.

Amostras lipémicas, grosseiramente hemolizadas ou contaminadas, poderão produzir resultados imprecisos e não deverão ser testados através deste procedimento. Acrescente-se que não foram testadas drogas relativamente a interferências no ensaio.

Ver directivas CLSI: Procedimentos para o manuseamento e processamento de amostras de sangue (CLSI Document H18; Revisão atual)

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

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Levar todos os reagentes à temperatura ambiente (20-25° C) antes da sua utilização.

Tampão de Lavagem (1X) - Se se formaram cristais no concentrado, aquecer até à temperatura ambiente e agitar com cuidado até que os cristais se dissolvam completamente. Diluir 100 mL do tampão de lavagem concentrado em água desionizada ou destilada para preparar 2500 mL de Tampão de Lavagem (1X).

Solução Substrato - Os Reagentes de Cor A e B devem ser misturadas juntamente em iguais volumes no espaço de 15 minutos após a mistura. São necessários 200 µL desta mistura por poço. Jogar fora Soluções Substrato preparadas e não utilizadas.

PREPARAÇÃO DE SOLUÇÃO SUBSTRATO DE ACORDO COM A DIMENSÃO DO ENSAIO		
Número total de poços a utilizar no ensaio	Volume de Reagente da Cor A	Volume de Reagente da Cor B
96	11 mL	11 mL
48	6 mL	6 mL
32	4 mL	4 mL

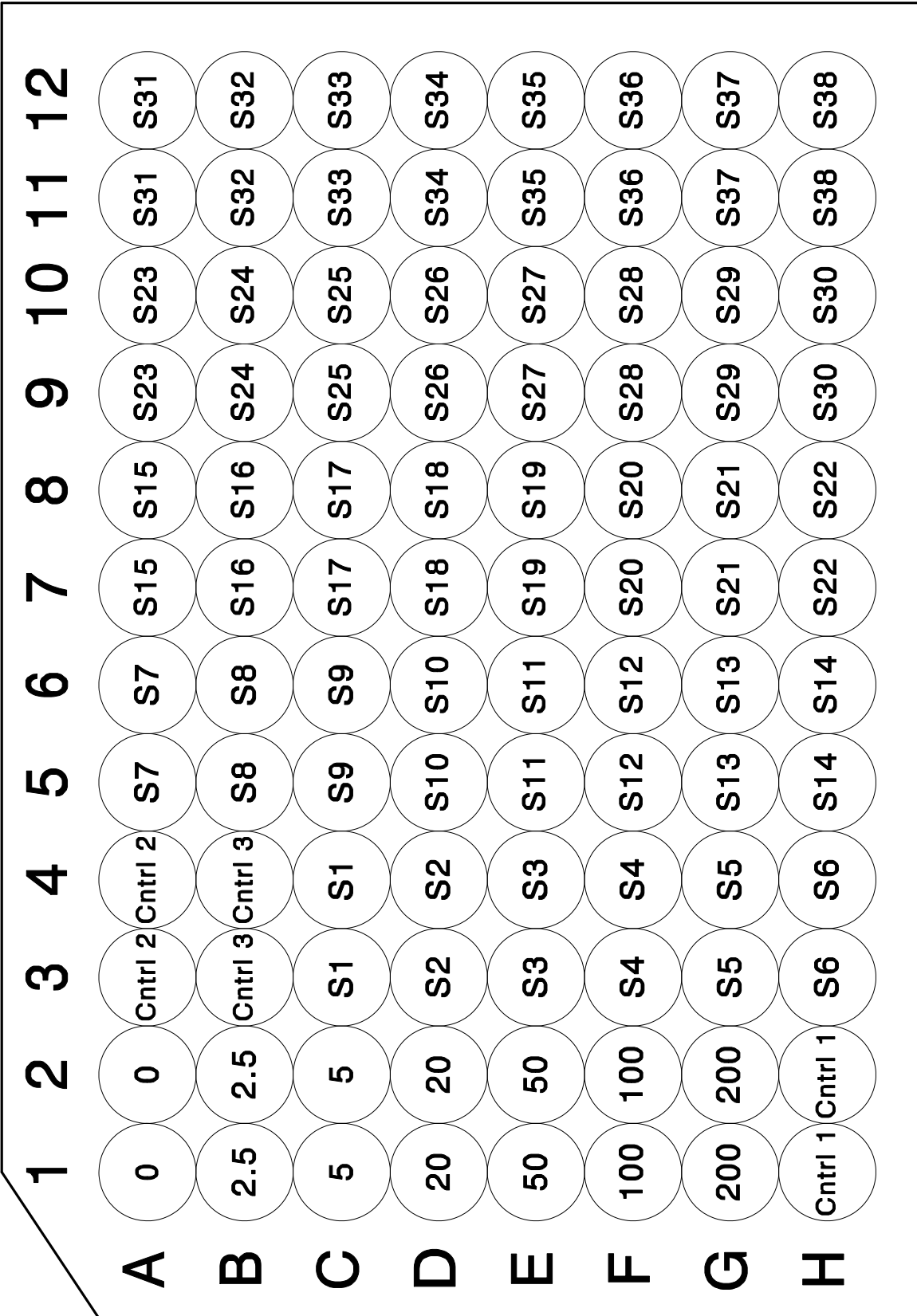
PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente (20-25° C) antes da sua utilização. Recomenda-se que todas as amostras, standards e controlos sejam ensaiados em duplicado. São apresentados dois protocolos: de bancada e de agitação. Ao longo do ensaio tem que ser seguido sempre o mesmo protocolo. Preparar todos os reagentes, tal como indicado no capítulo anterior.

1. Abrir a embalagem que contém a microplaca.
2. Retirar as strips de poços em excesso e guardá-las na embalagem que contém o dissecante e voltar a selá-la.
3. Pipetar 100 µL de Diluente de Ensaio Epo para cada poço.
4. Adicionar 100 µL de Standard, controlo ou amostra por poço. Bater levemente na microplaca durante cerca de 1 minuto para misturar o conteúdo dos poços. Cobrir a microplaca com a película fornecida. Na página 92 apresenta-se um layout da placa contendo um diagrama de standards, controlos e amostras.
Para o protocolo de Bancada: Incubar durante 2 horas \pm 5 à temperatura ambiente.
Para o protocolo de Agitação: Incubar durante 1 hora \pm 5 minutos à temperatura ambiente (20-25° C) num agitador de microplacas orbital (órbita 0,12") regulado a 500 \pm 50 rpm.
5. Aspirar bem o conteúdo de cada poço. Secar bem invertendo a microplaca sobre toalhas de papel. **Não lavar.**
6. Adicionar 200 µL de Conjugado Epo a cada poço. Cobrir a placa com uma nova película adesiva.
Para o protocolo de Bancada: Incubar durante 2 horas \pm 5 à temperatura ambiente.
Para o protocolo de Agitação: Incubar durante 1 hora \pm 5 minutos à temperatura ambiente (20-25° C) num agitador de microplacas orbital.
7. Aspirar cada poço e lavar, repetindo o processo três vezes, num total de 4 lavagens. A lavagem efectua-se enchendo cada poço com Tampão de Lavagem (400 µL), usando, garrafa de lavagem, dispensador manual ou pipetador automático. A remoção completa do líquido, em cada passo, é essencial para uma boa performance. Após a última lavagem, remover qualquer vestígio de Tampão de Lavagem por aspiração, ou invertendo a placa de encontro a uma toalha de papel.
8. Adicionar 200 µL de Solução Substrato a cada poço (**Nota:** a Solução Substrato deve ser utilizada no prazo de 15 minutos após preparação). Incubar durante 20-25 minutos à temperatura ambiente (20-25° C) **na bancada.**
9. Adicionar 100 µL de Solução Stop a cada poço. Se a mudança da cor não parecer uniforme, agitar a placa com cuidado para assegurar uma boa mistura.
10. Determinar a densidade óptica (D.O.) de cada poço no prazo de 15 minutos, utilizando um espectrofotómetro regulado a 450 nm. Se a correcção do comprimento de onda estiver disponível, regular a 600 nm. Se a correcção do comprimento de onda não estiver disponível, subtrair as leituras a 600 nm das leituras a 450 nm. Esta subtracção corrigirá as imperfeições ópticas da microplaca de poliestireno. As leituras efectuadas directamente a 450 nm sem correcção poderão ser mais elevadas e menos precisas.

LAYOUT DA PLACA

A seguir apresenta-se um diagrama exemplificativo para standards, controlos e amostras:



CÁLCULO DOS RESULTADOS

Ler a absorbância de cada poço num espectrofotómetro usando 450 nm como o comprimento de onda primário e 600 nm como o comprimento de onda de referência (540, 570 ou 650 nm é aceitável).

Calcular a média das leituras dos duplicados para cada standard, controlo e amostra e subtrair a média da densidade óptica do standard 0 mIU/mL.

Criar uma curva standard usando software capaz de gerar uma curva logística (4PL) de 4 parâmetros. Em alternativa, construir uma curva standard das absorbâncias médias de cada standard no eixo X, em função da concentração no eixo Y e desenhar a curva que melhor se adapte aos pontos do gráfico. Os dados podem ser linearizados, traçando graficamente os log das concentrações de Epo versus os log da D.O., determinando-se a melhor recta através de uma regressão linear. Este procedimento produzirá um ajuste adequado mas menos preciso dos dados.

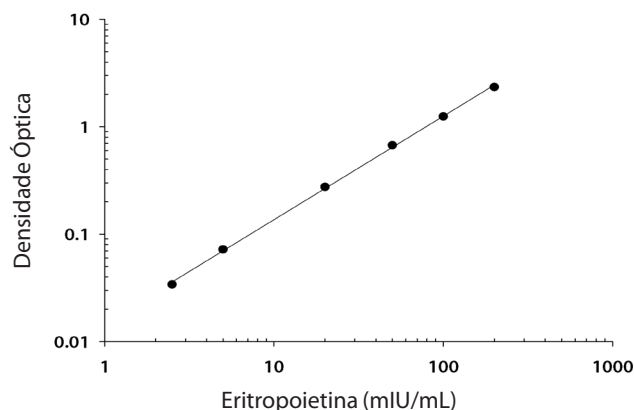
Registar os valores obtidos para cada amostra, cuja leitura se situe dentro dos limites do ensaio (2,5-200 mIU/mL). Para os valores acima do intervalo, consultar o capítulo Diluição das Amostras com Elevada Concentração de EPO.

Para valores inferiores aos dos limites, registar como não detectável ou < 2,5 mIU/mL.

VALORES TÍPICOS

Estas curvas standard são apresentadas apenas como demonstração. Deve ser gerada uma curva standard para cada conjunto de amostras ensaiadas.

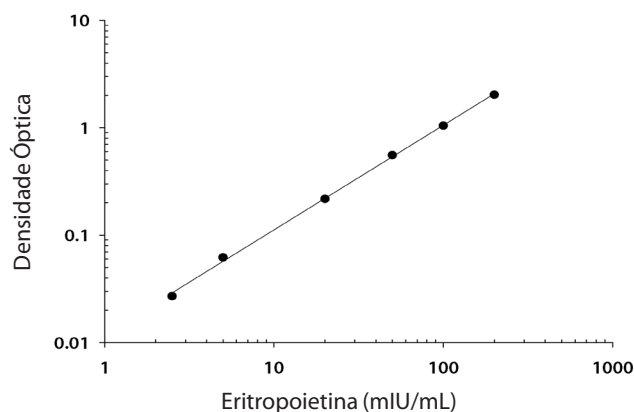
Protocolo de Bancada



Protocolo de Bancada

(mIU/mL)	D.O.	Média	Corrigida
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

Protocolo de Agitação



Protocolo de Agitação

(mIU/mL)	D.O.	Média	Corrigida
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

DILUIÇÃO DE AMOSTRAS COM ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE EPO

Se uma amostra de soro ou plasma apresentar mais que 200 mIU/mL, deve-se diluí-la com Diluente das Amostras.

Por exemplo:

- Para amostras com concentrações de Epo entre 200 mIU/mL e 2000 mIU/mL, é necessária uma diluição de 1:10 do soro. Diluir 25 µL de soro com 225 µL de Diluente das amostras.
- Para amostras com concentrações de Epo superiores a 2000 mIU/mL, será necessária uma diluição mais elevada por forma a enquadrar os valores nos limites da curva standard (i.e. diluições de 1:20, 1:40, etc.).

Nota: Usar tubos de ensaio de polipropileno ou polietileno de alta densidade (HDPE) para as diluições das amostras. **NÃO USAR TUBOS DE VIDRO.** O uso de tubos de vidro causa resultados erróneos devido à adsorção de EPO ao vidro.

Para determinar a concentração de Epo nas amostras de soro ou plasma, multiplicar o resultado obtido pelo factor de diluição utilizado.

CONTROLO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve estabelecer um programa de controlo de qualidade para monitorizar a performance do imunoensaio Quantikine IVD Epo. Como parte deste programa de controlo, controlos para ensaio de concentração conhecida de Epo (disponíveis na R&D Systems) devem ser testados em cada ensaio. A R&D Systems recomenda que pelo menos dois controlos sejam testados para verificar a performance do método de ensaio. Controlos nas regiões média superior dos limites normais e um controlo na região média da curva de ensaio, são boas opções para avaliar a performance dos ensaios de rotina. Pode ser também testado um controlo posicionado no limite superior da curva do ensaio para avaliar a performance no limite superior. Se os valores obtidos não se situarem nos limites estabelecidos, os resultados do ensaio deverão ser invalidados.

Os resultados de um ensaio individual são válidos se os standards e controlos se situarem dentro dos desvios padrão publicados de um controlo comercialmente disponível ou nos limites dos desvios-padrão estabelecidos de um controlo do próprio laboratório. O coeficiente da correlação da curva standard deve ser $\geq 0,95$.

GUIÃO PARA A RESOLUÇÃO DE POSSÍVEIS PROBLEMAS

Geralmente, as falhas do teste ELISA são devidas a erros técnicos ou problemas de reagentes. Se um ensaio falhar, verificar a data de validade dos reagentes individualmente e assegurar que todos os reagentes foram armazenados como indicado nos rótulos. Consultar também o capítulo INDICAÇÕES DE INSTABILIDADE OU DETERIORAÇÃO para informações adicionais. Se a performance do ensaio é questionável ou se ocorre um problema quando o ensaio está a decorrer, poderá detectar o problema consultando a tabela seguinte.

PROBLEMA	FONTE PROVÁVEL	TESTE OU ACÇÃO
% C.V. elevada (elevada variabilidade dos duplicados relativamente às exigências de precisão individual do laboratório)	Lavagem incompleta dos poços	Assegurar que o lavador está a funcionar convenientemente
	Aspiração inadequada dos poços	Os poços devem parecer secos após aspiração
	Mistura incompleta dos Reagentes da Cor A e B	Assegurar uma boa mistura da Solução Substrato
	O agitador derramou o conteúdo dos poços na película que cobre a microplaca	Calibrar o agitador para 500 ± 50 rpm
	Adição de volumes desiguais aos poços	Verificar se as pipetas estão calibradas e a funcionar bem
Delta inferior reduzido ($< 0,015$ D.O.) ou ruído de fundo elevado	Lavagem incompleta dos poços	Assegurar que o lavador está a funcionar convenientemente
	Aspiração inadequada dos poços	Os poços devem parecer secos após aspiração
	Adição de volumes desiguais aos poços	Verificar se as pipetas estão a funcionar bem
	As Reagentes da Cor A e B foram misturadas muito cedo	A Solução Substrato deve ser utilizada no prazo de 15 minutos após preparação
Fraca correlação da Curva Standard ($r < 0,95$)	Erro de pipetagem	Considerar a edição dos resultados, de acordo com o procedimento do laboratório
Revelação da cor inadequada	Aspiração dos poços inadequada	Os poços devem parecer secos após a aspiração
	Adição de volumes desiguais aos poços	Verificar se as pipetas estão calibradas e a funcionar bem
	Tempos ou temperaturas de incubação incorrectas	Verificar tempos e/ou temperaturas de incubação
	Falha no Conjugado ou Reagente da Cor	Misturar iguais volumes (i.e.: $100 \mu\text{L}$ de cada) de Reagente da Cor A e B, e Conjugado Epo. A cor deverá desenvolver-se imediatamente
Derrame do conteúdo dos poços na película que cobre a microplaca	Rotações do agitador demasiado elevadas	Calibrar o agitador para 500 ± 50 rpm

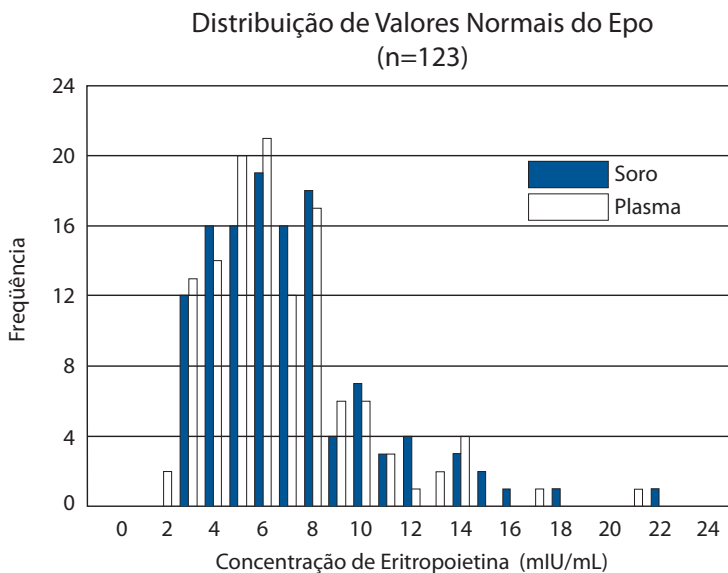
VALORES ESPERADOS

Intervalos normais

Os intervalos normais para o soro e plasma em EDTA foram determinados usando o Kit Quantikine IVD Epo ELISA. As concentrações de eritropoietina foram obtidas a partir de 123 indivíduos normais da área de Minneapolis/St. Paul, Minnesota (EUA). Usando o método não paramétrico para a análise de valores de referência descrita na publicação NCCLS "How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory" (NCCLS Document C28-P; Vol. 12, No. 2), estabeleceram-se os intervalos de referência seguintes (percentil 2,5-97,5) para a Epo no soro e plasma com EDTA. Cada laboratório de análise deve estabelecer os seus próprios intervalos normais.

Limites normais de Epo

Soro	Plasma com EDTA
3,3-16,6 mIU/mL	3,1-14,9 mIU/mL



Intervalos dos Estados de Doença

Pacientes que sofrem de policitemia rubra vera podem apresentar concentrações de Epo dentro dos intervalos normais, enquanto que os pacientes que sofrem de policitemia secundária podem ter concentrações elevadas de Epo no soro. Os pacientes com policitemia rubra vera que sofrem flebotomias podem ter concentrações séricas de Epo elevadas.

Os pacientes que sofrem da maior parte das anemias, apresentarão concentrações de Epo superiores ao normal, ao passo que os que sofrem de anemias associadas a falhas renais crônicas podem ter concentrações séricas de Epo dentro dos valores normais deste ensaio. Pacientes anêmicos que recebem transfusões podem exibir concentrações séricas de Epo inferiores aos valores esperados.

Concentrações anormalmente elevadas de Epo sérica podem também ser observadas em vários outros estados patológicos, incluindo neoplasmas renais, tumores benignos, doença policística renal, cistos renais e hidronefrose.

Os resultados deste ensaio devem ser usados em conjunção com informação disponível de outras avaliações clínicas e procedimentos diagnósticos.