IBL International GmbH Flughafenstraße 52 a 22335 Гамбург, Німеччина

Тел. +49 (0) 40 53 28 91-0
Факс +49 (0) 40 53 28 91-11

IBL@tecan.com
www.tecan.com/ibl

Інструкція з використання

Еритропоетин ІФА

Імуноферментний аналіз для кількісного визначення еритропоетину (EPO) у сироватці крові людини.

REF **NM56011**

Σ **96**

2°C 8°C

EU: IVD CE

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1,тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua

IBL International GmbH
Flughafenstrasse 52a
22335 Гамбург, Німеччина

1. ВИКОРИСТАННЯ ЗА ПРИЗНАЧЕННЯМ

Еритропоетин ІФА призначений для діагностики in vitro для кількісного визначення ЕРО (еритропоетин) у сироватці крові людини. Цей аналіз призначений для виявлення підвищеного або зниженого рівня ЕРО у сироватці крові людини, для діагностики анемій і поліцитемій для професійного використання.

2. ПІДСУМКИ ТА ПОЯСНЕННЯ

Еритропоетин (ЕРО) - це сильно глікозильований білок з молекулярною масою приблизно 30 000 - 34 000 Дальтон. ЕПО людини — це поліпептид, що складається з 165 амінокислот, який містить один О-зв'язаний і три N-зв'язані вуглеводні ланцюги1. Рекомбінантний ЕРО є хорошою заміною нативного білка для використання в імунологічному аналізі2. Рівні ЕРО в сироватці крові залежать від швидкості виробництва та швидкості кліренсу білка. Дев'яносто відсотків ЕРО виробляється в перитубулярних клітинах дорослої нирки у відповідь на зниження оксигенації тканин 3,4. Є дані, які вказують на те, що білок на цих клітинах, який визначає насичення крові киснем, є частиною, що містить гем 5. У міру того як pO2 плазми знижується функція гематокриту, концентрація ЕРО зростатиме6. Існують також спостереження, які свідчать про те, що зазвичай існує зворотна кореляція між рівнями ЕПО в сироватці крові та масою еритроцитів7.

Кількісне визначення концентрації еритропоетину в сироватці крові служить діагностичним допоміжним засобом для визначення причини анемії або еритроцитозу. Апластична анемія, гемолітична анемія та анемія, спричинена дефіцитом заліза, призводять до підвищення рівня ЕПО в сироватці крові. Тоді як рівні ЕРО у пацієнтів із вторинною анемією внаслідок ниркової недостатності та інших розладів, таких як синдром набутого імунодефіциту (СНІД), як правило, невідповідно низькі для ступеня анемії. Ймовірно, це спричинено порушенням здатності хворої нирки виробляти достатню кількість ЕРО8. Низькі концентрації ЕРО можуть бути раннім попередженням про відторгнення трансплантованої нирки10. ЕРО також можна використовувати для моніторингу пацієнтів зі СНІДом, які проходять терапію зидовудином (AZT). Підвищена концентрація ЕРО підтверджує, що анемія, пов'язана з терапією зидовудином, спричинена гіпоплазією або апліазією еритроцитів10.

Істинна поліцитемія червона, або первинний еритроцитоз (збільшення маси еритроцитів) є результатом нестимульованої надлишкової продукції еритроцитів. Таким чином, підвищення рівня гемоглобіну спричиняє зниження виробництва ЕРО, що призводить до субнормальних рівнів ЕРО9 у сироватці крові. Вторинні поліцитемії, які також характеризуються збільшенням загальної маси еритроцитів, виникають як фізіологічна відповідь на підвищений рівень циркуляційного ЕПО, спричинений гіпоксією тканин. Гіпоксія може бути спричинена такими факторами, як легеневий фіброз, серцево-судинні захворювання, тривале перебування на великій висоті, аномальні форми гемоглобіну або медикаментозне лікування10. Деякі пухлини продукують ЕРО, і в цих випадках ЕРО можна використовувати як онкомаркер для моніторингу ефективності лікування.

3. ПРИНЦИП АНАЛІЗУ

Імунологічний аналіз еритропоетину — це двосайтовий ІФА [імуноферментний аналіз] для вимірювання біологічно активного ланцюга з 165 амінокислот ЕРО. Він використовує два різних мишачих моноклональних антитіла до людського ЕРО, специфічні для чітко визначених ділянок на молекулі ЕРО. Одне мишаче моноклональне антитіло до людського ЕРО біотинілюється, а інше мишаче моноклональне антитіло до людського ЕРО помічається пероксидазою хрону [HRP] для виявлення.

Стрептавідін лунка– Біотинільований анти-ЕРО (моноклональний мишачий) – ЕРО – HRP кон'югований анти-ЕРО (мишачий моноклональний)

У цьому аналізі стандарти, контролі або зразки пацієнтів одночасно інкубують із антитілом, міченим ферментом, і антитілом, зв'язаним з біотином, у лунці мікропланшету, покритого стрептавідином. Наприкінці інкубації аналізу мікролунку промивають для видалення незв'язаних компонентів, а фермент, зв'язаний із твердою фазою, інкубують із субстратом, тетраметилбензидином (TMB). Потім додають кислий зупиняючий розчин, щоб зупинити реакцію та перетворити колір на жовтий. Інтенсивність жовтого кольору прямо пропорційна концентрації ЕРО у зразку. Крива доза-відповідь одиниці поглинання в порівнянні з концентрацією генерується з використанням результатів, отриманих від стандартів. Концентрації ЕРО, присутні в контролі та зразках пацієнтів, визначаються безпосередньо з цієї кривої. Стандарти були відкалібровані відповідно до міжнародного стандарту еритропоетину Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), який складається з ЕРО, отриманого з рекомбінантної ДНК. Еталонним стандартом ВООЗ був 1-й міжнародний стандарт еритропоетину (87/684).

4. КОМПОНЕНТИ НАБОРУ

Кількість	символ	Компонент / Опис
1 x 12 x 8	PLA	**Мікропланшет** Готовий до використання. Один тримач зі стріпами, покритими стрептавідином.
1 x 3,5 мл	RGT 1	**Реагент 1, біотинільоване антитіло** Готовий до використання. Містить: біотинільоване EPO антитіло [мишаче моноклональне проти EPO людини], що містить ProClin 300 як консервант
1 x 3,5 мл	RGT 2	**Реагент 2, антитіло до пероксидази** Готовий до використання. Містить: пероксидаза (фермент), помічена EPO антитіло [мишачий моноклональний антилюдський EPO]
1 x 30 мл	RGT A CONC	**Реагент A, промивний концентрат**(20x) Містить: фізіологічний розчин з поверхнево-активною речовиною з консервантом ципрофлоксацином гідрохлорид.
1 x 20 мл	RGT B	**Реагент B, субстрат ТМБ** Готовий до використання. Містить: тетраметилбензидин.
1 x 2 x	CTRL1+2 LYO	**Контроль 1+2**(ліофілізований) Містить: 2 рівні. Синтетичний h-EPO (1-165) у забуференому білковому розчині. Кожен контроль містить консервант ципрофлоксацину гідрохлорид. Точні діапазони дивіться на етикетках флаконів.
1 x 6 x	CAL AF LYO	**Стандарти A-F** (ліофілізовані) Точні концентрації дивіться на етикетках флаконів. Стандарт A: 0 мМО/мл Ліофілізований нульовий стандарт - це буферний білковий розчин і все інше Стандарти складаються з синтетичного h-EPO (1-165) у буферному білковому розчині. Ці стандарти були відкаліброваніі відповідно до Мирової Організації здоров'я еритропоетину 1-й міжнародний стандарт [рекомбінантна ДНК похідне EPO] (87/684). Кожен стандарт містить консервант ципрофлоксацину гідрохлорид.
1 x 20 мл	SOLN	**Розчин для зупинки** Готовий до використання. Містить: 1 N сірчану кислоту.

4.1. Матеріали та обладнання необхідні, але не надаються

- Зчитувач мікропланшетів, здатний зчитувати при 450 нм і 405 нм.
- Мийка для мікропланшетів [якщо мийка недоступна, допускається ручне миття].
- Точні дозатори для доставки 25, 200, 100 і 150 мкл.
- (Додатково): багатоканальний дозатор або повторюваний дозатор на 25, 100 і 150 мкл.
- Таймер з точністю ± 2 хвилини.
- Дистильована або дейонізована вода.
- Орбітальний ротатор або шейкер.
- Шейкери мікропланшетів: ІФА підтримуватиме оптимальну продуктивність за таких налаштувань швидкості:

Шейкери MTP	Діаметр струшування	Налаштування швидкості	Різні типи шейкерів з різними специфікації є комерційно доступними. в якщо шейкер для мікропланшетів не впадає всередину зазначеного діапазону, кожна лабораторія заохочується встановити власний оптимальний діапазон.
Орбітальний	3 мм (0,1118 дюйма)	600 ± 10 об/хв	
	19 мм (0,75 дюйма)	170 ± 10 об/хв	
Лінійний	25 мм (0,98 дюйма)	170 ± 10 об/хв	

5. ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ДЛЯ КОРИСТУВАЧІВ

Паспорти безпеки (SDS) доступні за запитом. **ОБЕРЕЖНО ПОТЕНЦІЙНА БІОЛОГІЧНА НЕБЕЗПЕКА** Незважаючи на те, що реагенти, що входять до складу цього набору, спеціально розроблені, щоб не містити компонентів крові людини, зразки пацієнтів, які можуть бути позитивними на HBsAg, HBcAg або антитіла до ВІЛ, повинні розглядатися як потенційно інфекційні біологічно небезпечні. Слід дотримуватися загальних запобіжних заходів у поводженні з будь-яким неперевіреним зразком пацієнта. **УВАГА** Цей пристрій містить матеріал тваринного походження, і з ним слід поводитися як з потенційним носієм і збудником хвороб.

Розчин для зупинки складається з 1 н. сірчаної кислоти. Це сильна кислота. Незважаючи на те, що він розведений, з ним потрібно поводитися обережно. Це може спричинити опіки, тому з ним слід працювати в рукавичках, окулярах і відповідному захисному одязі. Будь-яке пролиття слід негайно витерти великою кількістю води. Не вдихайте пари та уникайте вдихання. Використовувати тільки в добре провітрюваних приміщеннях.

Реагент ІФА 1, Біотинільоване антитіло EPO містить ProClin 300 як консервант. Уникайте контакту та надягайте рукавички під час роботи з цим реагентом. У разі випадкового контакту зі шкірою негайно промийте шкіру м'яким милом і водою. Промийте очі водою протягом 15 хвилин, якщо реагент потрапив в очі (очі). У разі проковтування уникайте блювоти та дайте велику кількість води. Негайно зверніться до лікаря.

ІФА Реагент А, промивний концентрат, EPO Стандарти і Контролі містять ципрофлоксацину гідрохлорид як консервант. Тримайте від персоналу, який продемонстрував чутливість до препаратів на основі хіноліну. Жінкам, які є або можуть бути вагітними, слід уникати будь-якого контакту з Ципрофлоксацином. Якщо в будь-якому реагенті спостерігається помутніння, не виконуйте аналіз і зверніться до свого постачальника.

6. ЗБІР ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Визначення EPO слід проводити на сироватці крові людини. Для повторного аналізу зразка потрібно 400 мкл людської сироватки. Настійно рекомендується збирати зразок з 7:30 ранку до 12:00 дня, оскільки в літературі повідомлялося про добові коливання еритропоетину.11,12 Збирайте цільну кров без антикоагулянту та дайте крові згорнутися при 2–8°C, якщо це можливо. Повідомлялося, що зразки сироватки, згорнуті при кімнатній температурі (від 22°C до 28°C), спричиняли зниження значення EPO за оцінкою радіоімунологічного аналізу приблизно на 30% порівняно з згортанням на льоду.13 Потім сироватку слід негайно відокремити, бажано в охолодженій центрифузі, і зберігати при -15°C або нижче. Зразки сироватки можна зберігати до 24 годин при температурі 2-8°C. Зразки сироватки, заморожені при -15°C, стабільні до 12 місяців. Не зберігайте зразки в морозильних камерах із саморозморожуванням. Уникайте повторного заморожування та розморожування зразків. Для тривалого зберігання зразків рекомендується розподіляти зразки в пробірки або флакони перед заморожуванням. Перед використанням дайте всім зразкам нагрітися до кімнатної температури (від 22 °C до 28 °C) і перемішайте, обережно перевертаючи або перемішуючи. Уникайте сильно гемолізованих або сильно ліпемічних зразків.

7. ПРИГОТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ РЕАГЕНТІВ

<u>Зберігайте всі компоненти набору при температурі 2-8°C.</u>

1. Усі реагенти, крім стандартів, контролів набору та промивного концентрату, готові до використання. Зберігайте всі реагенти при 2-8°C.
2. Для нульового стандарта розведіть флакон з 4 мл дистильованої або дейонізованої води та перемішайте. Для кожного з ненульових стандартів (Стандарт B–F) і контрольних наборів 1 і 2 відновіть кожен флакон 2 мл дистильованої або дейонізованої води та перемішайте. Дайте флаконам постояти 10 хвилин, а потім ретельно перемішайте, обережно перевертаючи, щоб забезпечити повне відновлення. Використовуйте стандарти та контролі якомога швидше після відновлення. Заморозьте (-15°C) решту стандартів і контролів якомога швидше після використання. Стандарти та контролі стабільні при -15°C протягом 6 тижнів після відновлення з до 3 циклів заморожування та відтавання, якщо поводитись відповідно до рекомендацій у розділі «Процедурні примітки».
3. **ІФА Реагент А**: Концентрат для миття: Ретельно перемішайте вміст концентрату для миття. Якщо в концентраті для промивання утворився осад через зберігання при нижчій температурі, наприклад 4°C, розчиніть флакон, помістивши його у водяну баню з температурою 37°C або в духовку, обертаючи або перемішуючи. Додайте промивний концентрат (30 мл) до 570 мл дистильованої або дейонізованої води та перемішайте. Розведений робочий промивний розчин стабільний протягом 90 днів при зберіганні при кімнатній температурі.

8. ПРОЦЕДУРА АНАЛІЗУ

1. Помістіть достатню кількість стріпів, покритих стрептавідином, у тримач для роботи всіх шести (6) стандартів, A . F стандартів EPO [точна концентрація вказана на етикетці флакону], контролю та зразків пацієнтів. Призначте щонайменше дві лунки, які будуть служити «заготовками». Зверніться до кроку 9 для остаточного зчитування планшета.
2. Внесіть 200 мкл стандартів, контролів і зразків у призначену або нанесену на карту лунку. Заморозьте (-15°C) решту стандартів і контролів якомога швидше після використання.
3. Додайте або розподіліть 25 мкл реагенту 1 (біотинільоване антитіло) у кожну лунку, яка вже містить стандарти, контролі та зразки.
4. Додайте або розподіліть 25 мкл реагенту 2 (антитіла, мічені ферментом) у кожну з тих самих лунок. Щільно постукайте мікропланшетом об твердий предмет, наприклад ручку, щоб досягти ретельного змішування зразка з реагентами. Для повної впевненості в змішуванні повторіть постукування щонайменше 5 разів для кожної з трьох із чотирьох сторін пластини, що залишилися. Будьте обережні, щоб уникнути проливання. Накрийте мікропланшет(и) алюмінієвою фольгою або лотком, щоб уникнути впливу світла, і помістіть його на шейкер із рекомендованими налаштуваннями (див. розділ 4) на 2 години ± 15 хвилин при кімнатній температурі (22–28°C).
5. Спочатку повністю аспіруйте рідину, а потім промийте/аспіруйте кожну лунку п’ять (5) разів робочим промивним розчином (приготованим з реагенту A), використовуючи автоматичну промивку мікропланшетів. Об’єм промивного розчину має бути встановлений таким чином, щоб у кожну лунку було введено 0,35 мл.
6. Додайте або розподіліть 150 мкл реагенту B для ІФА (субстрат ТМБ) у кожну лунку, за винятком пустих лунок. Постукайте по мікропланшету, як описано в кроці (4).
7. Закривши відповідну кришку, щоб уникнути впливу світла, помістіть мікропланшет(и) у шейкер із рекомендованими налаштуваннями (див. розділ 4) на 30 ± 5 хвилин при кімнатній температурі (22–28°C).
8. Додайте або розподіліть 100 мкл зупиняючого розчину в кожну з лунок, крім порожніх лунок. Постукайте по мікропланшету, як описано в кроці (4). Будьте обережні, щоб уникнути проливання. Протріть нижню частину лунок серветкою без ворсу.
9. Перед зчитуванням переконайтеся, що обидві «порожні лунки», як зазначено в кроці 1, заповнені 250 мкл дистильованої або дейонізованої води. Очистіть планшет-рідер згідно з інструкціями виробника, використовуючи порожні лунки.* Прочитайте поглигання розчину в лунках протягом 10 хвилин, використовуючи мікропланшет-рідер, встановлений на 450 нм. Прочитайте планшет ще раз, встановивши зчитувач на 405 нм, також проти дистильованої або дейонізованої води.

* Якщо з технічних причин планшетний рідер ІФА не можна налаштувати на нуль за допомогою «бланка», відніміть «порожнє» значення поглинання з усіх інших значень поглинання, щоб отримати результати.

Примітка. Друге зчитування призначене для розширення аналітичної валідності калібрувальної кривої до значення, представленого найвищим стандартом, яке становить приблизно 450 мМО/мл (точна концентрація надрукована на етикетці флакона і дещо змінюватиметься від однієї партії до іншої). Отже, зразки пацієнтів з EPO

> передостанній [від 2-го до найвищого] стандарт, тобто стандарт E., можна визначити кількісно за калібрувальною кривою, що складається з показань аж до концентрації, еквівалентної найвищому стандарту, використовуючи значення 405 нм, далеко від довжини хвилі максимального поглинання. Зразки пацієнтів і контрольні зразки слід зчитувати за довжини довжини довжини 450 нм для концентрацій EPO до концентрації Стандарт E. Концентрації EPO, показані вище, ніж у Стандарт E, слід інтерполювати за допомогою зчитування 405 нм.

10. Використовуючи кінцеві значення поглинання, отримані на попередньому кроці, побудуйте дві калібрувальні криві, використовуючи зчитування 405 нм і 450 нм через кубічний сплайн, логістику 4 параметрів або інтерполяцію від точки до точки для кількісного визначення концентрації EPO.

8.1. Процедурні примітки

- Зразки, які мають значення нижче межі виявлення (1,1 мМО/мл), повинні позначатися як < 1,1 мМО/мл.
- Рекомендується, щоб усі стандарти, контролі та зразки пацієнтів аналізувалися в двох примірниках, доки аналітик або технік не набуде достатнього досвіду (що підтверджується коефіцієнтом варіації дублікату менше 10 % [за винятком значень нижче 2-го ненульового найнижчого стандарту] та здатністю отримати результати для контролів набору в межах запропонованих прийнятних діапазонів).
- Зразки слід піпетувати в лунку з мінімальною кількістю повітряних бульбашок.
- Зразки пацієнтів із значеннями, вищими за найвищий стандарт (Стандарт F), який становить приблизно 450 мМО/мл (див. точну концентрацію на етикетці флакона, оскільки вона може відрізнятися від однієї партії до іншої), необхідно розбавити Стандартом A (нульовий стандарт) і повторно проаналізувати. Помножте результат на коефіцієнт розведення.Крім того,результат

може бути вищий за найвищу концентрацію стандарта (Стандарт F). Наприклад, якщо стандарт F має призначене значення EPO 494 мМО/мл, у звіті має бути «> 494 мМО/мл».

- Реагенти з різних номерів партій не можна замінювати.
- За бажанням змішайте в рівних об'ємах у достатній для аналізу кількості реагент 1 (біотинільоване антитіло) і реагент 2 (антитіло, мічене ферментом) у чистій бурштиновій пляшці. Комбінований реагент стабільний протягом семи (7) днів при зберіганні при 4°C. Потім внесіть 50 мкл змішаних антитіл у кожну лунку. Цей альтернативний метод має замінити кроки (3) і (4), які слідують з інкубацією.
- При змішуванні уникайте розбризкування реагентів з лунок. Це вплине на точність і точність аналізу.

9. ПІДРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

9.1. Ручний метод

1. Для показань 450 нм побудуйте криву доза-відповідь (калібрувальна крива), використовуючи перші п'ять наданих стандартів, тобто стандарти A, B, C, D і E. Для показань 405 нм побудуйте другу криву доза-відповідь, використовуючи стандарти A, D, E і F.
   Побудуйте криву дози-відповіді (калібрувальну криву), використовуючи стандарти A, B, C, D і E.
2. Призначте концентрацію для кожного стандарта, зазначену на флаконі, у мМО/мл. Нанесіть дані з калібрувальної кривої на лінійний міліметровий папір із концентрацією на осі X і відповідним AU на осі Y.
3. Проведіть пряму лінію між 2 сусідніми точками. Цей математичний алгоритм широко відомий як обчислення «точка-точка». Отримайте концентрацію зразка, розмістивши одиницю поглинання на осі Y і знайшовши відповідне значення концентрації на осі X. Зразки пацієнта та контрольні зразки слід зчитувати з використанням 450 нм для концентрацій EPO до передостаннього [від 2-го до найвищого] стандарта, тобто стандарта E. Концентрації EPO вище концентрації передостаннього стандарта (у наведеному нижче прикладі як 156 мМО/мл) слід інтерпольувати за допомогою зчитування 405 нм.

9.2. Автоматизований метод

Комп'ютерні програми, що використовують кубічний сплайн або 4 PL [4 Parameter Logistics] або Point-to-Point, загалом можуть дати хорошу відповідність. Для зчитування 450 нм побудуйте криву дози-відповіді (калібрувальну криву), використовуючи перші п'ять наданих стандартів, тобто стандарти A, B, C, D і E. Для зчитування 405 нм побудуйте другу криву дозо-відповіді, використовуючи стандарти A, D, E і F. Побудуйте криву дозо-відповіді (калібрувальну криву), використовуючи стандарти A, B, C, D і E.

Зразок даних *при 450 нм* [зчитування необробленої AU проти дистильованої або дейонізованої води]

Мікропланшетна лунка	**1-е читання** Одиниця поглинання	**2-е читання** Одиниця поглинання	**Середній** Одиниця поглинання	**EPO** мМО/мл
Стандарт A	0,006	0,006	0,006	0
Стандарт Б	0,094	0,092	0,093	10.3
Стандарт C	0,232	0,219	0,226	24.8
Стандарт Д	0,509	0,474	0,492	48
Стандарт E	1,918	1,799	1,859	156
Контроль 1	0,171	0,170	0,171	18.2
Контроль 2	2.27	2.20	2.24	184
Зразок пацієнта 1	0,012	-------	0,012	1.1
Зразок пацієнта 2	0,031	-------	0,031	3.2
Зразок пацієнта 3	0,089	-------	0,089	9.6
Зразок пацієнта 4	0,508	-------	0,508	50.1
Зразок пацієнта 5	3,283	-------	3,283	>156*

* Оскільки концентрація цих зразків перевищує концентрацію стандарта E, наприклад, 156 мМО/мл, рекомендується використовувати дані, отримані при 405 нм, як показано в Даних зразків при 405 нм у таблиці нижче.

Зразок даних *при 405 нм* [зчитування необробленої AU проти дистильованої або дейонізованої води]

Мікропланшетна лунка	1-е читання	2-е читання	Середній	ЕРО
	Одиниця поглинання	Одиниця поглинання	Одиниця поглинання	мМО/мл
Стандарт А	0	0	0	0
Стандарт Д	0,14	0,13	0,135	48
Стандарт Е	0,538	0,508	0,523	156
Стандарт Ф	2.06	2.03	2.04	523
Контроль 1	0,046	0,044	0,045	<156**
Контроль 2	0,649	0,626	0,638	184
Зразок пацієнта 1	0,000	------	0,000	<156**
Зразок пацієнта 2	0,007	------	0,007	<156**
Зразок пацієнта 3	0,023	------	0,023	<156**
Зразок пацієнта 4	0,14	------	0,14	<156**
Зразок пацієнта 5	1,161	------	1,161	302

** Для зразків із концентраціями, нижчими за концентрацію стандарта Е, наприклад 156 мМО/мл, рекомендується використовувати дані, отримані при 450 нм, як показано в Даних зразків при 450 нм у таблиці вище.

Ця практика повинна дати результати з оптимальною чутливістю аналізу.

ПРИМІТКА. Представлені дані наведені лише для ілюстрації та не повинні використовуватися замість даних, отриманих під час аналізу.

10. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Контрольні зразки або пули сироватки слід аналізувати під час кожного запуску стандартів і зразків пацієнтів. Результати, отримані в результаті аналізу контрольних зразків, повинні бути оцінені на прийнятність за допомогою відповідних статистичних методів. Коли лабораторія вперше запроваджує цей аналіз ЕРО, оприлюднення результатів зразків пацієнтів має ґрунтуватися на тому, чи відповідають результати контрольного набору запропонованим прийнятним діапазонам. Якщо одне або кілька значень зразка контролю якості виходять за допустимі межі, аналіз слід повторити. Після того, як лабораторія згенерує власні дані, параметри контролю якості повинні базуватися на статистичних даних лабораторії, використовуючи контрольний набір та/або пули сироватки, виготовлені лабораторією. Для результатів контролю необхідно використовувати графіки Леві-Дженнінга. Якщо результати для всіх контрольних зразків знаходяться в межах середнього значення + 2 стандартних відхилення, без остаточної тенденції або зміщення даних контролю якості, аналіз слід вважати прийнятним. Щоб відповідати правилам CLIA 88, слід дотримуватися правила Westgard. Якщо результати контролю не відповідають заявленим параметрам, як описано, результати аналізу є недійсними.

11. ОБМЕЖЕННЯ ПРОЦЕДУРИ

Очищені білки IgG тих самих видів, що й ті, для яких були отримані антитіла для захоплення та мічення, на додаток до одного комерційного блокатора гетерофільних антитіл, були включені в реагенти для мінімізації гетерофільних антитіл.14 Тим не менш, немає гарантії, що гетерофільні перешкоди були повністю усунені. Таким чином, рекомендується аналізувати принаймні три розведення будь-яких підвищених та/або підозрілих позитивних результатів, щоб виявити непаралельність порівняно з еталонними стандартами.15

Оскільки результати, отримані за допомогою одного комерційного аналізу ЕРО, можуть суттєво відрізнятися від результатів, отриманих за допомогою будь-якого іншого, рекомендується, щоб будь-яке серійне тестування, що виконується на тому самому пацієнті протягом тривалого часу, проводилося з тим самим комерційним тестом ЕРО.16 Цей тест може бути недостатньо чутливим, щоб послідовно відрізняти аномально низькі значення ЕРО від нормальних рівнів ЕРО.

Нижчі рівні ЕРО, ніж очікувалося, спостерігалися при анеміях, пов’язаних із такими захворюваннями: ревматоїдний артрит, синдром набутого імунодефіциту, рак, виразковий коліт17, серповидно-клітинна анемія та у недоношених новонароджених.18

Після алогенної трансплантації кісткового мозку порушення реакції еритропоетину може сповільнити відновлення еритропоетину.17 Пацієнти з гіпергаммаглобулінемією, пов’язаною з множинною мієломою або хворобою Вальденстрема, мають порушення вироблення еритропоетину залежно від концентрації гемоглобіну. Це було пов’язано з підвищеною в’язкістю плазми.17 Жодні препарати не досліджувалися на вплив аналізу.

Рівні ЕРО у людей, які живуть на великій висоті з еритроцитозом, можуть швидко впасти до норми після повернення на низьку висоту.19

Добавки з високим вмістом біотину, наприклад ті, що продаються для покращення стану волосся, шкіри та нігтів, можуть містити впливаючі кількості біотину. Рівень біотину, вищий за рекомендовану добову норму, може вплинути на аналіз. Тому важливо спілкуватися з медичними працівниками та пацієнтами щодо споживання біотину під час збору зразків, щоб запобігти неправильним результатам тесту. Результати показують, що найвища концентрація, при якій не спостерігалося значного впливу, становить 1 нг/мл D-біотину.

Використання повного або напівавтоматичного обладнання для дозування реагентів та/або промивання планшета має бути перевірено лабораторією на еквівалентність результатів, отриманих вручну. Для діагностичних цілей результати завжди слід оцінювати в поєднанні з історією хвороби пацієнта, клінічним обстеженням та іншими даними.

12. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Рівні ЕРО були виміряні у 120 начебто нормальних осіб у США за допомогою ІФА на еритропоетин. Вибірки складаються з 61 чоловіка та 59 жінок віком від 18 до 96 років. Немає суттєвої статистичної різниці щодо референтних діапазонів, отриманих від жіночої та чоловічої популяції даних. Цей висновок про те, що немає гендерної різниці, узгоджується з літературними даними 21. Крім того, значення ЕРО не мають суттєвої залежності від віку, за винятком того, що вищі значення були отримані у зразках із ранніх фаз дорослого життя, тобто приблизно від 22 до 42 років). Використовуючи непараметричний метод для аналізу референтних значень, викладений у публікації NCCLS «Як визначити, визначити та використовувати референсні інтервали в клінічній лабораторії» (NCCLS Document C28-A, том 15, № 4), референсні діапазони (2,5–97,5 процентиля) становили 3,22–31,9 мМО/мл для ЕРО у сироватка. Кожна лабораторія повинна встановити власний діапазон очікуваних нормальних значень.

«У пацієнтів з еритроцитозом внаслідок некомпенсованої гіпоксії сироватковий імунореактивний ЕРО підвищений; у пацієнтів з компенсованою гіпоксією рівень імунореактивного ЕПО в сироватці зазвичай знаходиться в межах норми, а у пацієнтів із справжньою поліцитемією імунореактивний ЕРО в сироватці або нормальний, або низький. Таким чином, хоча підвищений рівень ЕПО в сироватці свідчить про те, що еритроцитоз є вторинним явищем, а низький рівень ЕПО підтверджує можливість автономного еритропоезу, нормальний рівень ЕПО в сироватці крові не виключає ні гіпоксію, ні автономне виробництво ЕПО як причину еритроцитозу». 20

13. ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

13.1. Точність

Сто двадцять шість (126) зразків пацієнтів із значеннями ЕРО в діапазоні від 5,2 до 291 мОд/мл були проаналізовані за допомогою процедури ІФА на еритропоетин і набору ЕРО ICMA (Імунохемілюмінесцентний метричний аналіз). Аналіз лінійної регресії дає такі статистичні дані:

Еритропоетин ІФА = 0,88 ICMA Kit - 1,63 мМО/мл r = 0,96 n = 126

13.2. Можливість виявлення

Межа виявлення бланк (LoB), межа виявлення (LoD) і межа кількісного визначення (LoQ) були визначені для аналізу ЕРО ІФА відповідно до рекомендацій CLSI EP17-A2. LoB визначається як найвищий результат вимірювання, який, імовірно, можна спостерігати для холостого зразка. ІФА для еритропоетину має LoB 0,175 мМО/мл. Межа виявлення (LOD) визначається як найнижча концентрація ЕРО, яку можна виявити з імовірністю 95%. ІФА для еритропоетину має LOD 0,795 мМО/мл. LoQ визначається як найнижча концентрація ЕРО, яку можна виявити при загальному CV менше ніж 20 %. ІФА для еритропоетину має LoQ 4,2 мМО/мл.

13.3. Точність і відтворюваність

13.4. Варіація в аналізі

Точність тесту ІФА в аналізі на еритропоетин розраховували на основі 22 повторних визначень кожного з двох зразків.

Зразок	Середнє значення	Н	Коефіцієнт варіації
А	11,9 мМО/мл	22	7,6 %
Б	121 мМО/мл	22	3,4 %

13.5. Варіація між аналізами

Точність між аналізами ІФА-тесту на еритропоетин була розрахована на основі даних двох зразків, отриманих у 15 різних аналізах.

Зразок	Середнє значення	Н	Коефіцієнт варіації
А	15,5 мМО/мл	15	10,2 %
Б	134 мМО/мл	15	4,1 %

13.6. Специфічність і перехресна реактивність

Перехресну реактивність в ЕРО вивчали шляхом додавання різних речовин до нульового стандарта (CAL A).

Перехресний реагент	Кількість доданого перехресного реагенту
Трансферин людини	400 мкг/мл
Людський білірубін (некон'югований)	83 мкг/мл
Гемоглобін людини	500 мкг/мл
Альфа-глобулін людини	50 мг/мл
Альфа2-макроглобулін людини	500 мкг/мл
Людський α 1-кислотний глікопротеїн,	800 мкг/мл
Людський α1-антитрипсин	500 мкг/мл
Тригліцериди	14 мг/мл
Людський альбумін	50 мг/мл
Гамма-глобулін людини	50 мг/мл
АКТГ (інтактна молекула: амінокислотна послідовність 1-39)	5 000 пг/мл
ТТГ	100 мкМО/мл

Жоден із перехресних реагентів не заважає цьому ІФА на еритропоетин у досліджуваних концентраціях. Дуже невеликі зміни в ЕРО, які спостерігалися для деяких перехресних реагентів, були в межах статистичних меж аналізу.

13.7. Відновлення

Різні кількості ЕРО додавали до чотирьох різних сироваток пацієнтів для визначення одужання. Результати описані в наступній таблиці:

Сироватка Зразок	Ендогенний ЕРО	ЕРО додано	Очікуваний Значення	Вимірюване Значення	Відновлення
А	34,8 мМО/мл	--	--	--	--
	32,2 мМО/мл	84,1 мМО/мл	116,3 мМО/мл	115,8 мМО/мл	99,6 %
	29,6 мМО/мл	168,3 мМО/мл	197,9 мМО/мл	209,1 мМО/мл	105,7 %
Б	9,1 мМО/мл	--	--	--	--
	8,4 мМО/мл	84,1 мМО/мл	92,5 мМО/мл	93,3 мМО/мл	100,8 %
	7,7 мМО/мл	168,3 мМО/мл	176,0 мМО/мл	167,0 мМО/мл	94,9 %
С	14,6 мМО/мл	--	--	--	--
	13,5 мМО/мл	84,1 мМО/мл	97,6 мМО/мл	119,0 мМО/мл	121,9 %
	12,4 мМО/мл	168,3 мМО/мл	180,7 мМО/мл	208,0 мМО/мл	115,1 %
Д	59,5 мМО/мл	--	--	--	--
	55,0 мМО/мл	84,1 мМО/мл	139,1 мМО/мл	159,4 мМО/мл	114,6 %
	50,6 мМО/мл	168,3 мМО/мл	218,9 мМО/мл	262,0 мМО/мл	119,7 %

13.8. Лінійність розведень зразків пацієнтів: паралелізм

Три зразки сироватки пацієнтів були розведені стандартом А (нульовий стандарт). Результати (в мМО/мл), як показано нижче:

Зразок	Розведення	Очікуваний	Спостерігається	Спостерігається ÷ Очікується
А	нерозбавлений	--	347 мМО/мл	--
	1:2	174 мМО/мл	167 мМО/мл	96%
	1:4	86,8 мМО/мл	79,8 мМО/мл	92 %
	1:8	43,4 мМО/мл	36,3 мМО/мл	84 %
Б	нерозбавлений	--	272 мМО/мл	--
	1:2	136 мМО/мл	128 мМО/мл	94 %
	1:4	68,0 мМО/мл	61,4 мМО/мл	90 %
	1:8	34,0 мМО/мл	33,1 мМО/мл	97%
С	нерозбавлений	--	>500,0 мМО/мл	--
	1:2	--	225 мМО/мл	--
	1:4	113 мМО/мл	106 мМО/мл	94 %
	1:8	56,3 мМО/мл	52,0 мМО/мл	92 %

13.9. Ефект хука високої дози

Набір для аналізу еритропоетину ІФА не виявив «ефекту крюка високої дози» у стандартному розчиннику, доданому 200 000 мМО/мл ЕРО. Крім того, три зразки з відомими високими значеннями ЕРО (1 920 мМО/мл, 1 520 мМО/мл і 966 мМО/мл) були протестовані без розведення, і їхні результати виявились набагато вищими за найвищий стандарт. Однак зразки з рівнями ЕРО, вищими за найвищий стандарт, слід розбавити та повторно перевірити на правильні значення.

14. СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сойєр С.Т., Кранц С.Б., Савада К. Рецептори еритропоетину в еритроїдних клітинах миші та людини та плаценті. Кров 1989; 74: 103-109.
2. Imai, N., Kawamura, A., Higuchi, M. та ін. Фізико-хімічне та біологічне порівняння рекомбінантного еритропоетину людини з еритропоетином сечі людини. J Biochem 1990; 107: 352-359.
3. Якобсон Л.О., Голдвассер Е., Фрід В., Пізак Л.Ф. Роль нирки в еритропоезі. Природа 1957; 179: 633-634.
4. Koury, ST, Bondurant, MC, Koury, MJ Локалізація клітин, що синтезують еритропоетин, у мишачих нирках шляхом гібридизації in situ. Кров 1988; 71: 524-527.
5. Голдберг, Массачусетс, Даннінг, С.П., Банн, HF. Регуляція гена еритропоетину: докази того, що Датчик кисню - це гемовий білок. наук 1988; 242: 1412-1415.
6. Erslev, AJ, Caro, J., Birgegard, G., Silver, R., Miller, O. Біогенез еритропоетину. Експериментальна гематологія 1980; Додаток 8: 1-13.
7. Співак Я. Л. Механізм дії еритропоетину. Int J Cell Cloning 1986; 4: 139-166.
8. Erslev, AJ Еритропоетин. New Eng J Med 1991; 324:1339-1344.
9. Гарсія, Дж. Ф., Ебббе, С. Н., Холландер, Л., Каттинг, Х. О., Міллер, М. Е., Кронкітс, Е. П. Радіоімунний аналіз еритропоетину: циркулюючі рівні у нормальних і поліцитемічних людей. J Lab Clin Med 1982; 99: 624-635.
10. Вайлд, Д., редактор. The Immunoassay Handbook, Stockton Press, 1994, стор. 428.
11. Wide L., Bengtsson C., Birgegard G. Circadian Rhythm of Erythropoietin in Human Serum. Br J Haematol 1989; 72: 85-90.
12. Cahan C., Decker MJ, Arnold JL, Washington LH, Veldhuis JD, Goldwasser E., Strohl KP. Добові варіації рівнів еритропоетину в сироватці крові у здорових суб’єктів та пацієнтів із апное уві сні. J Appl Physiol 1992; 72: 2112-7.
13. Goldwasser E. and Sherwood JB Анотація, радіоімунний аналіз еритропоетину. Br J Haematol 1981; 48: 359-63.
14. Kricka LJ Вплив людських антитіл проти тварин на імунологічні аналізи. Clin Chem 1999; 45: 942-956.

15. Cotes PM і Spivak JL Еритропоетин у здоров'ї та хворобах. Молекулярна, клітинна та клінічна біологія еритропоетину, редактори: Erslev AJ, Adamson JW, Wschbach JW, Winearls CG 1991; Розділ 11:184-207.
16. Jelkmann W. Нирковий еритропоетин: властивості та виробництво. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1986;
104: 139-215.
17. Cotes MP Аномалії рівнів циркулюючого еритропоетину. Annals of NY Acad, Sci
1994; 718:103-9.
18. Wintrobe's Clinical Hematology, дев'яте видання, під редакцією Lee GR, Bithell TC, Foerster J., Athens JW, Lukens JN Lea & Febiger, Philadelphia 1993.
19. Фербенкс B. Q & A. CAP Today, листопад 1996 р., стор. 88.
20. Співак, Ж.Л. «Еритроцитоз», Гематологія: Основи та практика; редактори: Hoffman R, Benz EJ Jr., Shattil, SJ; Ф'юрі Б., Коен Х.Дж.; Зільберштейн Л.Є.; 1995 рік; Розділ 37:484-491
21. Міллер, М.Е., Чандра М., Гарсія Дж.Ф.: «Клінічні застосування вимірювання рівнів імунореактивності в сироватці крові
еритропоетину”, Ann. NYAcad. Sci. 459: 375-381, 1985.

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ

REF	№ Кат.:
LOT	№ Партії:
	Використати до:
	Кількість тестів:
CONC	Концентрат
LYO	Ліофілізований
IVD	Медичний пристрій для діагностики in vitro
	Оціночний набір
	Прочитайте інструкцію перед використанням
	Зберігати поодаль від джерел тепла і прямого сонячного світла.
	Зберігати при температурі:
	Виробник:
	Увага!
BIO	Містить біологічний матеріал людського походження
BIO	Містить біологічний матеріал тваринного походження
UDI	Унікальна ідентифікація пристрою
	Дистриб'ютор
Умовні позначення компонентів див. у розділі «Матеріали, що входять до набору».	

СКАРГИ: Первинно скарги можна пред'явити в письмовому вигляді або усно. Згодом необхідно подати їх, включаючи хід дослідження та отримані результати, в письмовому вигляді, з аналітичних міркувань.

ГАРАНТІЯ: Гарантується відсутність у продукті дефектних матеріалів у межах відповідного терміну придатності, а також дотримання специфікацій, поданих разом із продуктом. Продукт слід використовувати за призначенням, відповідно до всіх інструкцій, наведених в інструкції з використання та в межах відповідного терміну придатності продукту. Будь-яка модифікація процедури аналізу, або обміну, або змішування компонентів різних партій може негативно вплинути на результати. Ці випадки анулюють будь-які вимоги про заміну.

ОБМЕЖЕННЯ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ: ЗА БУДЬ-ЯКИХ ОБСТАВИН РІВЕНЬ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ ВИРОБНИКА ОБМЕЖУЄТЬСЯ ЗАКУПІВЕЛЬНОЮ ВАРТІСТЮ ВКАЗАНОГО (-ИХ)НАБОРУ(ІВ) . ЗА ЖОДНИХ УМОВ ВИРОБНИК НЕ МАЄ НЕСТИ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ ЗА ВИПАДКОВІ ЧИ ПОБІЧНІ ЗБИТКИ, У ТОМУ ЧИСЛІ ВТРАТУ ПРИБУТКУ, ВТРАТУ ПРОДАЖ, ТРАВМИ ЛЮДЕЙ ЧИ ПОШКОДЖЕННЯ ВЛАСНОСТІ АБО ІНШІ ВИПАДКОВІ ЧИ НЕПРЯМІ ЗБИТКИ.

IBL International GmbH
Flughafenstr. 52A, 22335 Гамбург, Німеччина
Тел .: + 49 (0) 40 532891 -0 Факс: -11
E-MAIL: IBL@IBL-International.com
WEB: http://www.IBL-International.com

Уповноважений представник: ТОВ «АЙ ВІ СЕТ», 01010, м. Київ, вул. Омеляновича-Павленка, буд. 19 А, оф. 1,тел. (044) 223-83-18, info@ivset.ua www.ivset.ua