

EPO-Trac™
¹²⁵I RIA Kit

For the quantitative determination of
Erythropoietin in serum or plasma

Instruction Manual

Manuel d'Instructions

Testanleitung

Manual de Instrucciones

Manuale di Istruzioni

Manual de instruções

Návod k použití

Εγχειρίδιο οδηγιών

REF: 23200

DiaSorin

Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.

TABLE OF CONTENTS

English	Page 1
Français	13
Deutsch	26
Español	38
Italiano.....	50
Português.....	63
Cesky	75
Ελληνικά.....	87

EPO-Trac ¹²⁵I RIA KIT

1. INTENDED USE

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

The EPO-Trac™ RIA kit is intended for the quantitative determination of erythropoietin (EPO) in serum or EDTA plasma by radioimmunoassay (RIA) as an aid in the diagnosis of anemias and polycythemias.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein hormone (34,000 daltons) that stimulates the maturation of red blood cell precursors. EPO is secreted by the kidney in response to the blood's oxygen content. Normally when oxygen levels fall, as in physiological hypoxia, the level of EPO in the circulation system increases and stimulates the increased production of red blood cells.¹

Abnormal blood levels of circulating EPO are characteristic of specific pathological disorders including various anemias, polycythemia and tumors. Overproduction of EPO has been associated with renal carcinoma. Some liver tumors and other organ tumors have been associated with ectopic erythropoietin production.²

Anemia is characterized by inadequate levels of red blood cells.² Anemic patients presenting with elevated EPO levels include aplastic anemia, iron deficiency anemia and hemolytic anemia. Anemia associated with chronic renal failure is a result of insufficient production of EPO by the kidney.

Overproduction of red blood cells is called polycythemia. In untreated polycythemia rubra vera, overproduction of red blood cells by hematopoietic progenitors occurs in the presence of low or undetectable EPO concentrations.³

Secondary (stress) polycythemia is caused by increased production and release of EPO resulting in increased red blood cell mass. Secondary polycythemia may be caused by various factors such as smoking, kidney stones, pulmonary fibrosis, cardiac disease, tumors, or defective hemoglobin.²

Several methods have been developed to measure erythropoietin in humans and animals. Initial assays development included and *in vivo* bioassay utilizing exhypoxic polycythemic live mice.^{4,5} With the development of recombinant human erythropoietin, *in vitro* assays were also developed which were less time consuming and less expensive. These *in vitro* assays include radioimmunoassay (RIA) and enzyme immunoassay (EIA).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The DiaSorin EPO-Trac ¹²⁵I RIA procedure is a competitive binding, disequilibrium radioimmunoassay which utilizes recombinant human erythropoietin for both tracer and calibrators. Samples are incubated with the EPO-Trac primary goat antibody (goat anti-EPO) and allowed to react for 2 hours before EPO-Trac tracer labeled with iodine-125 is added. Following an overnight incubation, the donkey anti-goat precipitating complex (DAG-PPT) secondary antibody is added to the specific assay test tubes (TABLE I). The DAG-PPT is a donkey anti-goat serum that is pre-precipitated with a normal goat serum and a surfactant. The DAG-PPT is incubated with calibrators or samples, primary antibody and tracer, for thirty minutes before the test tubes are centrifuged to separate the bound from the unbound tracer. The unbound tracer is removed by decanting the supernatant from each test tube. The bound tracer in the remaining DAG-PPT complex pellets is counted in a gamma counter for 1 minute. The ¹²⁵I counts are inversely proportional to the amount of EPO present in each sample.

4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

EPO-Trac Primary Antibody (BLUE)	1 vial/11 mL
EPO-Trac Calibrators (0-5)	1 vial/11 mL, 5 vials/2.1 mL
EPO-Trac DAG-ppt	2 vials/35 mLs
EPO-Trac Tracer (RED)	1 vial/11 mL
EPO-Trac Controls	2 vials/2.1 mL
Number of tests	100

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. After opening, store each reagent at 2-8° until the expiration date on the label. Reagents should not be used past the expiration date. The expiration date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiration date of the tracer.

Reagents from different batches must not be mixed.

4.1 EPO-Trac Calibrators, 0-5: ready to use reagent

Six recombinant erythropoietin calibrators, at nominal concentrations ranging from approximately 0 to 280 mU/mL, are prediluted in buffered saline with protein stabilizers, anti-microbials and 0.1% sodium azide. Calibrators are referenced against World Health Organization (WHO) 2nd IRP Erythropoietin, HUM, Urinary/Bioassay 67/343⁶ and WHO (IS) International Calibrator for Erythropoietin, Recombinant DNA (rDNA) - derived code #87/684. The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as recommended.

4.2 ¹²⁵I EPO-Trac: ready to use reagent

Human recombinant erythropoietin is labeled with iodine-125, 2 µCi (74 kBq), and diluted in buffered saline with protein stabilizers, antimicrobials, 0.1% sodium azide and Food, Drug and Cosmetic (FD & C) red dye No. 40.

4.3 EPO-Trac Primary Antibody: ready to use reagent

Goat anti-human EPO serum is diluted with buffered saline with protein stabilizers, anti-microbials, 0.1% sodium azide and FD & C blue dye No. 1.

4.4 EPO-Trac Precipitating Complex, DAG-PPT: lyophilized reagent

Donkey anti-goat serum is pre-precipitated with normal goat serum and surfactant, diluted in BSA-borate buffer with antimicrobials and 0.03% thimerosal and lyophilized. Reconstitute the vial with 35 mL of purified water; mix thoroughly until the suspension appears homogeneous and then allow it to stand for a minimum of 30 minutes at room temperature with occasional mixing. Swirl or mix with a small magnetic stirrer at very low speed while dispensing DAG-PPT into test tubes. If reagent shows evidence of rehydration prior to use, do not use.

4.5 EPO-Trac Controls, Levels 1 and 2: ready to use reagent

Human recombinant EPO is added to buffered saline with protein stabilizer to obtain a concentration within a specified range listed on the Certificate of Analysis. 0.1% sodium azide and other stabilizers are added.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

Not for internal or external use in humans or animals.

REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE

CAUTION: Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up. For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 1976.

European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

REAGENTS CONTAINING THIMEROSAL

Some reagents in this kit contain thimerosal which contains a mercury compound. Disposal of elemental mercury, inorganic mercury, mercury oxides and mercury compounds should be done in strict compliance with all local, state, and federal regulations.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause birth defects or other reproductive harm.

REAGENTS CONTAINING IODINE-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 2 μ Ci (74 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

WARNING: This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

ADDITIONAL WARNINGS

1. Avoid splashing or generating aerosols.
2. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results.
3. Microbial contamination of reagents may give incorrect results.
4. Do not substitute reagents with those from other lots or other manufacturers.

6. SPECIMEN REQUIREMENTS

CAUTION: Patient specimens and all materials coming into contact with them should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.

COLLECTION AND STORAGE OF SERUM OR PLASMA

An adequate sample of blood should be collected aseptically by venipuncture in a 5 or 10 mL evacuated sterile glass tube to yield a minimum of 400 μ L of serum or EDTA plasma per assay (for 2 replicates). Care should be taken to remove the serum from the clot promptly by centrifugation to avoid hemolysis. Centrifuge serum or plasma at room temperature for 10 minutes at 760 \times g*. EDTA (72 mg/5 mL blood) should be used as the anticoagulant for plasma. No further additives or preservatives are required to maintain sample integrity.

Serum or EDTA plasma should be placed in sterile covered storage tubes. Serum is stable up to 7 days at 4°C. For longer storage, freeze at -20°C in a non self-defrosting freezer. DiaSorin has shown serum samples to be stable up to 18 months when frozen continuously at -20°C. Serum samples should not be repeatedly frozen and thawed. All plastics, glassware or other material coming in contact with the specimen should be entirely free from contamination.

Fasting samples are recommended, but not required, to avoid unforeseen interference from lipid-soluble substances. Visibly hemolyzed samples should be discarded. Bilirubin (<5 mg/dL) has not been shown to interfere with this assay. No drugs have been examined for interference.

7. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

- 7.1 Rubber/latex gloves to wear while performing the test.
- 7.2 Disposable borosilicate glass tubes, 12 x 75 mm.
- 7.3 Temperature controlled centrifuge (20-25°C) to accommodate 12 x 75 mm tubes spun at 1600 \pm 20 g*.
- 7.4 Gamma scintillation counter calibrated and capable of counting iodine-125.
- 7.5 Vortex mixer.
- 7.6 Pipetting devices:
 - a. Micropipettors calibrated to deliver 200 (\pm 4) μ L.
 - b. Repeating dispensers calibrated to deliver 100 (\pm 2) μ L and 500 (\pm 5) μ L.
- 7.7 Purified water to dilute DAG-PPT.
- 7.8 Timer to accurately time to \pm 2 minutes.
- 7.9 Three cycle semi-log graph paper.

8. ASSAY PROCEDURE

- 8.1 Prepare unknown samples.
- 8.2 Set up labeled 12 x 75 mm disposable glass tubes in duplicate according to the Scheme of the Assay, on the back page.
- 8.3 Add reagents as follows:
 - a. **Total count tubes**
Set aside until step 6 (used for quality control calculations - see Quality Control section)
 - b. **Nonspecific binding tubes (NSB)**
200 μ L of calibrator 0 per tube
 - c. **Calibrator 0**
200 μ L of Calibrator 0 per tube

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm (rpm)})^2$$

- d. EPO-Trac Calibrators (1-5)**
200 µL of calibrator per tube
- e. Controls and unknown samples**
200 µL of each sample or control per tube
- 8.4** Add 100 µL of EPO primary goat antibody (blue) to each tube except the total count and NSB tubes.
- 8.5** Vortex the tubes gently and incubate for 2 hours (±10 minutes) at room temperature (20-25°C).
- 8.6** Add 100 µL of EPO tracer (red) to all tubes.
- 8.7** Vortex the tubes gently and incubate for 16-24 hours at 2-8°C.
- 8.8** Vigorously mix the DAG-PPT before dispensing. Swirl or mix DAG-PPT with a small magnetic stirrer at very low speed while dispensing 500 µL to all the tubes except the total count tubes.
- 8.9** Vortex; then incubate the tubes for 30 (±5) minutes at room temperature (20-25°C).
- 8.10** Centrifuge the tubes for 20 minutes using 1600 x g* at 20-25°C.
- 8.11** Set aside the total count tubes; then decant the supernatant from the remaining tubes into an appropriate radioactive waste container. Blot the tubes upside down on absorbent paper to remove any drops of supernatant that may be remaining on the rims before turning the tubes upright.
- 8.12** Using a gamma scintillation counter, count the precipitate of each tube and the total count tubes for 1 minute.

9. PROCEDURAL COMMENTS

- 9.1** Add each aliquot of reagent to the lower third of the assay tubes to ensure complete mixing of reagents.
- 9.2** If tubes cannot be decanted within 5 minutes after centrifugation is completed, the tubes should be re-centrifuged before decanting supernatant.
- 9.3** To completely monitor the consistent performance of an RIA there are additional factors which may be checked. DiaSorin suggests a regular check of the following parameters to assure consistent kit performance.

a. Total Counts

b. Maximum Binding

Average counts per minute (CPM) of Calibrator 0 Tubes / Average CPM of the Total Count Tubes.

c. Nonspecific Binding

Average CPM of NSB tubes / Average CPM of the Total Count Tubes.

d. Slope of Calibrator Curve

For example, monitor the 80%, 50% and 20% suppression points of the calibrator line.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm (rpm)})^2$$

10. QUALITY CONTROL

Each laboratory must include at least two controls in every assay to monitor assay performance. Commercially available controls or the two reference controls provided with the kit may be utilized. The kit controls contain EPO at two concentrations. The kit controls have been evaluated by DiaSorin using the DiaSorin EPO-Trac ¹²⁵I RIA Kit. The range of concentrations of each control is reported on the certificate of analysis and indicates the limits established by DiaSorin for control values that can be obtained in reliable assay runs. Quality control charts should be maintained to follow control performance. Acceptable performance limits should be determined by each individual laboratory for each level of control using statistically based methods designed to detect both systematic and random errors. Control results must meet the laboratory's criteria for acceptability prior to reporting patient test results.^{19,20,21}

11. CALCULATIONS OF RESULTS

There are many methods in existence for calculating results of RIAs. Each is based on obtaining a calibration curve by plotting the extent of binding against stated concentrations of the calibration calibrators. This graph may be either a linear or logarithmic scale. Each of these methods gives essentially the same values for controls and samples, although certain assays may "fit" better into one particular method versus another. The calculation method for the DiaSorin Quality Control Laboratory is % B/B₀ [amount of tracer bound by sample (B), divided by the amount of tracer bound by the zero calibrator (B₀) x 100] (see step 3 below) versus log concentration.

- 11.1 Calculate the average (CPM) for each calibrator, control, and unknown sample.
- 11.2 Subtract the average CPM of the Non Specific Binding (NSB) tubes from all counts.
- 11.3 Divide the corrected CPM of each calibrator, control, or sample, by the corrected CPM of the Calibrator 0.

$$\% B/B_0 = \frac{\text{CPM of Calibrator or Unknown Sample} - \text{CPM of NSB}}{\text{CPM of Calibrator 0} - \text{CPM of NSB}} \times 100$$

- 11.4 Using three cycle semi-log graph paper, plot percent B/B₀ for the EPO-Trac calibrators (vertical axis) versus the concentration printed on the quality control specification sheet (horizontal axis).
- 11.5 Draw a best-fit line through the points (FIGURE 1).
- 11.6 Interpolate the levels of erythropoietin in the unknown samples from the plot.
- 11.7 If any unknown sample reads <4.4 mU/mL, the limit of detection of this test, report value as <4.4 mU/mL.
- 11.8 If any unknown sample reads greater than the highest calibrator, it should be diluted with EPO-Trac Calibrator 0, Cat. No. 23211 and reassayed. Dilutions of 1:2 and 1:5 will be sufficient for most samples.

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- 12.1 The results of this assay should be used in conjunction with information available from clinical evaluations and other diagnostic procedures.
- 12.2 No drugs have been tested for assay interference.

TABLE II
DiaSorin EPO-Trac™ RIA Sample Data

Tube	CPM (mU/mL)	Average CPM	Average (CPM-NSB) (B)	Percent Bound (B/T)**	Percent Bound (B/B ₀)	Conc. (mU/mL)	*Corr. Conc.
Total Count	14,823						
(T)14,270	14,546						
NSB	492						
	447	470		3.2**			
Calibrator 0	4,783						
	4,904	4,844	4,374 (B ₀)	33**	100.0	0	
Calibrators							
1	4,321						
	4,273	4,297	3,827		87.5	9.0	
2	3,832						
	3,773	3,803	3,333		76.2	19.0	
3	2,896						
	2,920	2,908	2,438		55.7	39.0	
4	1,645						
	1,669	1,657	1,187		27.1	83.0	
5	865						
	932	898	428		9.8	290.0	
Control Level 1	3,924						
	3,877	3,901	3,431		74.4	16.9	
Control Level 2	1,918						
	1,935	1,927	1,457		33.3	69.3	
UKN No. 1	1,217						
	1,232	1,225	755		17.3	127	
1:2	1,832						
	1,873	1,853	1,383		31.6	72.6	124.8
UKN No. 2	1,508						
	1,437	1,472	1,002		22.9	96.6	
1:2	2,264						
	2,309	2,286	1,816		41.5	56.0	91.6

Typical sample data and a calibrator curve are shown in TABLE II and FIGURE 1; this information is for reference only and should not be used for the calculation of any value.

* Corr. conc. = Corrected concentration; for diluted samples only.

** These parameters are monitored for quality control purposes (see Quality Control section).

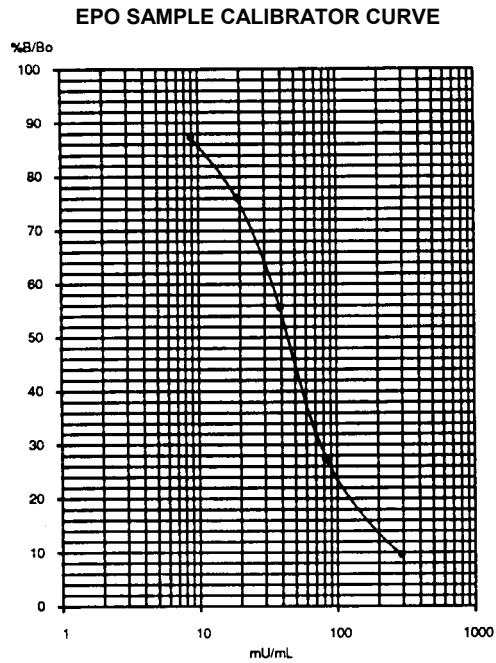


FIGURE 1

* This graph is generated from the Sample Data (TABLE II) and is for reference only. Do not use it for calculating your assay values.

13. EXPECTED VALUES

13.1 Normal Range

EACH LABORATORY SHOULD ESTABLISH ITS OWN NORMAL RANGE.

Serum erythropoietin levels were measured in one hundred and four (104) normal males and females (45 M, 61 F) from Minneapolis, Minnesota using the EPO-Trac RIA. The average EPO value was found to be 17.7 ± 7.5 mU/mL. Individual values ranged from a minimum of 4.9 to a maximum of 52.7 mU/mL. The average serum EPO value for normal females was 18.3, with 16.6 mU/mL for normal males. No statistical difference ($p = 0.27$) was observed between male and female EPO levels.

Several other investigations of normals, using in-house EPO RIAs found average EPO levels similar in magnitude to the above study.^{2,4,5} Some of these studies found significant but small differences between males and females, with females having slightly higher values than males.^{8,9} The results of these studies are summarized in the following table:

Study	Sex	n=	Mean \pm 1 S.D.
Koeffler 1981 ²	both	26	14.9 \pm 4.2 mU/mL
Garcia 1982 ⁴	males	364	17.2 \pm 5.5 mU/mL
	females	199	18.8 \pm 6.2 mU/mL
Ryner 1989 ⁵	males	50	8.0 \pm 3.2 mU/mL
	females	50	11.3 \pm 3.4 mU/mL

13.2 Disease State Values

Abnormal circulating EPO concentrations, when examined with other clinical information, may be characteristic of specific disease conditions.

Patients with polycythemia rubra vera typically present with normal or below serum EPO when measured with in-house RIA's.^{8,9} Those patients with secondary polycythemia brought on by hypoxia, as in congestive heart failure or chronic obstructive pulmonary disease, present with elevated EPO levels.^{3,8,9} Ectopic EPO production can sometimes result in elevated serum EPO and subsequent secondary polycythemia in patients with uterine myoma, cerebellar hemangioblastoma, hepatic carcinoma, and pheochromocytoma. Renal tumors, including hypernephroma, adenoma and sarcoma, can result in similar EPO-related erythrocytosis.²

Most anemic patients have elevated serum EPO although the extent of elevation is dependent on the degree and type of anemia. Elevations in serum EPO may be found in patients with sickle cell anemia or with HIV infection although EPO levels, on average, are less pronounced than in other anemias.^{10,11}

The anemias found in renal disease patients are thought to result from deficient erythropoietin production by diseased or absent kidneys. Anephric anemic dialysis patients have low or undetectable EPO levels.¹² On the other hand, dialysis-dependent patients, with end stage renal disease, usually have normal or elevated serum EPO. The levels of serum EPO seen in these patients, however, are thought to be inappropriately low for their degree of anemia.^{12,13} Patients with recent kidney transplants sometimes have elevated serum EPO in response to their anemia.¹⁴

In a clinical study in Minneapolis, Minnesota, EPO levels were measured by the EPO-Trac RIA in twenty eight (28) nephric dialysis patients with end-stage renal disease. Serum EPO levels averaged 38.4 ± 67.1 mU/mL (range: 10.4-360.6 mU/mL), while hemoglobin levels averaged 9.4 ± 1.6 g/dL (range: 6.9 to 12.3 g/dL). This value was considered to be inappropriately low for a patient population having an equivalent degree of anemia, but normal renal function.^{12,15} This study confirmed findings by previous investigators of relative erythropoietin deficiency in dialysis dependent patients.^{15,16} Additionally, erythropoietin levels were determined in a number of patient groups. The following table shows the average EPO levels measured. Patient controls were randomly selected from the patient population evaluated.

**Summary table of mean EPO levels in various patient groups
using the EPO-Trac RIA Kit**

Diagnosis	n	Mean EPO (mU/mL)	S.D.
Normals	36	15.7	10.5
Patient Controls	18	18.6	11.3
Dialysis Patients	28	38.4	67.1
Myelodysplasia	2	651.0	887.2
Myelofibrosis	2	116.0	147.5
Erythroid Hypoplasia/Aplasia	4	1545	1213
Non-Hodgkin's Lymphoma	15	26.4	13.8
Hodgkin's Disease	3	29.8	31.3
Chronic Lymphocytic Leukemia	3	17.4	9.7
Macroglobulinemia	2	30.2	15.1
Myeloma	3	49.7	52.3
Hemolytic Anemia	3	51.4	29.2
Miscellaneous Anemias	10	32.2	18.9
Erythrocytotic Patients	6	14.6	8.5
Polycythemia Vera Patients	6	20.7	4.9

Erythropoietin levels exhibited above may or may not be consistent with the disease states listed. All patients were in various stages of treatment which may alter the erythropoietin level expected for their specific disease state. Consideration must be given to individual patient status and health of their erythropoietic system when interpreting specific erythropoietin levels.

14. PERFORMANCE DATA

14.1 Reproducibility

Within-assay variation Serum (Values = mU/mL)

	Mean Value	S.D.	%C.V.**	N
LOW	11.1	1.3	11.9	20
LOW	12.4	1.2	10.0	20
LOW	22.9	1.2	5.2	10
MEDIUM	39.9	1.9	4.8	10
HIGH	106.5	5.1	4.8	10
HIGH	254.6	29.8	11.7	20

Between-assay variation Serum (Values = mU/mL)

	Mean Value	S.D.	%C.V.**	N
LOW	9.8	1.4	14.3	5
LOW	13.2	1.6	12.1	5
LOW	19.0	1.3*	6.7	5
MEDIUM	40.9	1.4	3.5	5
HIGH	147.6	15.7	10.6	5
HIGH	220.2	26.9	12.2	5

* Samples were run in five separate assays (n = 5)

** % C.V. = (S.D. ÷ Mean) 100

14.2 TRUENESS: THE ASSAY TRUENESS HAS BEEN CHECKED BY THE LINEARITY AND THE RECOVERY TEST.

Dilution Parallelism

Serial Dilution Study of Unknown Serum Samples

Sample	Dilution	EPO Mean (mU/mL)	% mean/ 0 Dilution Mean
1	0	15.6*	–
	1:2	17.4	111.5
2	0	127.1	–
	1:2	124.8	98.2
	1:4	141.2	111.1
	1:8	152.0	119.6
3	0	96.6	–
	1:2	91.6	94.8
	1:4	100.4	103.9
	1:8	100.0	103.5
4	0	51.3	–
	1:2	52.8	102.9
	1:4	38.4	74.9
			Mean = 102.3

* Zero dilution values were measured values prior to dilution with DiaSorin serum diluent.

Accuracy

Recovery Study Serum (Values = mU/mL)

Set No.	Background*	EPO Calibrator Added	Measured Value**	Percent Recovery ***
1	8.9	19.5	27.3	94.4
	8.9	41.5	51.9	103.6
	8.9	145.0	182.0	119.4
2	18.1	19.5	37.3	98.5
	18.1	41.5	66.0	115.4
	18.1	145.0	205.6	129.3
3	44.3	19.5	62.9	95.4
	44.3	41.5	87.6	104.3
	44.3	145.0	158.5	78.8
4	80.8	19.5	101.3	105.1
	80.8	41.5	127.1	111.6
	80.8	145.0	210.7	89.6
				Mean = 103.8

* Assayed sample value divided by 2.

** Equal volume of EPO-Trac calibrator 3, 4, and 5, and patient sample combined.

*** %Recovery = [(measured-background)/EPO added] x 100

14.3 Analytical Sensitivity (Limits of Detection)

The minimum detectable concentration of EPO is 4.4 mU/mL, when defined as the apparent concentration at 3 calibrator deviations from the counts at maximum or zero binding. Unknown samples reading less than the sensitivity of this assay should be reported as <4.4 mU/mL.

14.4 Analytical Specificity

Results from a cross-reactivity experiment using the EPO-Trac RIA system and 8 naturally occurring serum proteins showed <0.001% cross-reactivity when measured at the sensitivity of the assay (4.4 mU/mL).

Substances	% Cross-reactivity
Human albumin	<0.001
Granulocytic macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)	<0.001
Interleukin-3	<0.001
Alpha-1 antitrypsin	<0.001
Human chorionic gonadotropin	<0.001
Alpha-1 acid glycoprotein	<0.001
Human IgG	<0.001
Human IgM	<0.001

The gene sequence of erythropoietin was compared to all human gene sequences in the Genbank and EMBL data bases. The search found no genes to be significantly similar to the erythropoietin gene sequence.

14.5 Interference

Studies were evaluated according to CLSI methods to determine interference of hemoglobin, tryglyceride, and bilirubin. These studies indicate that no interference was observed.

14.6 Sample Type

Paired Plasma EDTA and Serum samples were shown to be highly correlated.

$Y(\text{SERUM}) = 0.9 + 0.993(\text{PLASMA})$; $r = 0.93$ (range: 4.7 - 42.5 mU/mL; serum).

SEE LAST PAGE FOR REFERENCES

TROUSSE RIA EPO-Trac I¹²⁵

1. INDICATION

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

La trousse EPO-Trac™ RIA permet la détermination quantitative de l'érythropoïétine (EPO) dans le sérum ou le plasma EDTA par une technique de dosage radio-immunologique (RIA) pour le diagnostic de l'anémie et la polycythémie.

2. RÉSUMÉ ET COMMENTAIRE

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone glycoprotéique (34 000 daltons) qui stimule la maturation des précurseurs des globules rouges. L'EPO est sécrétée par le rein et répond à la quantité d'oxygène présente dans le sang. Normalement, lorsque la quantité d'oxygène baisse, comme dans l'hypoxie physiologique, le taux d'EPO dans la circulation augmente et stimule la production de globules rouges.¹

Un taux anormal d'EPO en circulation dans le sang caractérise des troubles pathologiques spécifiques, comme les différentes anémies, polycythémies et les tumeurs. L'hypersécrétion d'EPO a été associée au carcinome rénal. Certaines tumeurs du foie et d'autres organes ont été associées à la production ectopique d'érythropoïétine.²

L'anémie est caractérisée par un taux de globules rouges inadéquat.² Parmi les sujets anémiques présentant un taux d'EPO élevé on trouve les patients atteints d'anémie aplastique, d'anémie ferriprive ou d'anémie hémolytique. L'anémie associée à un dysfonctionnement chronique du rein est le résultat d'une production insuffisante d'EPO par le rein.

Une hyperproduction de globules rouges est appelée polycythémie. Dans la polycythémie vera non traitée, la surproduction de globules rouges par les progéniteurs hématopoïétiques a lieu en présence de concentration basse ou indétectable d'EPO.³

La polycythémie vera (stress) est provoquée par une augmentation de la production et de la distribution d'EPO, ce qui engendre une augmentation de la masse de globules rouges. La polycythémie vera est causée par différentes facteurs, comme le tabagisme, les calculs rénaux, la fibrose pulmonaire, les maladies cardiaques, les tumeurs ou la déficience d'hémoglobine.²

Plusieurs méthodes ont été développées pour quantifier l'érythropoïétine chez les humains et les animaux. Le développement des premiers dosages comprenait un biodosage in vivo sur des souris vivantes polycythémiques exhypoxiques.^{4,5} Avec le développement de l'érythropoïétine humaine recombinante, les dosages in vitro ont été utilisés. Ils sont plus rapides et moins coûteux. Ces dosages in vitro comprennent le dosage radio-immunologique (RIA) et la méthode immuno-enzymatique (EIA).

3. DESCRIPTION DE LA METHODE DE DOSAGE

La procédure de dosage radio-immunologique DiaSorin EPO-Trac I¹²⁵ est un dosage radio-immunologique de déséquilibre à liaison compétitive qui utilise l'érythropoïétine humaine recombinante pour le traceur et les étalons. Les échantillons sont incubés avec l'anticorps primaire de chèvre EPO-Trac (chèvre anti-EPO). Ils doivent réagir pendant 2 heures avant l'adjonction de traceur EPO-Trac marqué à l'iode-125. Après l'incubation durant une nuit, le second anticorps du complexe (DAG-PPT) de précipitation de singe anti-chèvre est ajouté aux tubes à essai spécifiques au dosage (TABLEAU I). Le DAG-PPT est un sérum anti-chèvre de singe qui est fait pré-précipiter avec un sérum normal de chèvre et un surfactant. Le DAG-PPT est incubé avec les étalons ou les échantillons, l'anticorps primaire et le traceur, durant trente minutes. Les tubes à essais sont ensuite centrifugés pour séparer la liaison du traceur non lié. Le traceur non lié est retiré par décantation du surnageant de chaque tube à essais. Le traceur lié dans le reste des pastilles du complexe DAG-PPT est compté dans un compteur gamma pendant 1 minute. Les comptes I¹²⁵ sont inversement proportionnels à la quantité d'EPO présente dans chaque échantillon.

4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Anticorps primaire EPO-Trac (BLEU)	1 flacon / 11 mL
Étalons EPO-Trac (0-5)	1 flacon / 11 mL, 5 flacons / 2,1 mL
EPO-Trac DAG-ppt	2 flacons / 35 mL
Traceur EPO-Trac (ROUGE)	1 flacon / 11 mL
Contrôles EPO-Trac	2 flacons / 2,1 mL
Nombre de dosages	100

CONSERVATION : Dès réception, la trousse doit être stockée entre 2 et 8 °C. Après ouverture, conserver chaque réactif entre 2 et 8° jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption. La date de péremption de la trousse se trouve sur l'étiquette extérieure et correspond à celle du traceur.

Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

4.1 Étalons EPO-Trac 0-5 : réactif prêt à l'emploi

Six étalons d'érythropoïétine recombinants, à des concentrations nominales s'échelonnant entre 0 et 280 mU/mL approximativement, sont pré-dilués dans une solution saline de tampon avec des stabilisateurs protéiques, des anti-microbiens et 0,1% de nitrate de sodium. Les étalons sont référencés selon les documents de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2nd IRP Erythropoietin, HUM, Urinary/Bioassay 67/343⁶ et (IS) International Calibrator for Erythropoietin, Recombinant DNA (rdDNA) - derived code #87/684. Les étalons de la trousse démontrent leur commutabilité avec les échantillons de patients lorsqu'ils sont utilisés avec les réactifs et selon la procédure recommandés pour ce test in vitro.

4.2 ¹²⁵I EPO-Trac : réactif prêt à l'emploi

L'érythropoïétine humaine recombinante est marquée par de l'iode-125, 2 µCi (74 kBq), et diluée dans une solution saline tamponnée avec des stabilisateurs protéiques, des anti-microbiens, 0,1% de nitrate de sodium et du colorant rouge pour aliments, médicaments et cosmétiques N. 40.

4.3 Anticorps primaire EPO-Trac : réactif prêt à l'emploi

Le sérum EPO anti-humain EPO de chèvre est dilué avec une solution saline tamponnée avec des stabilisateurs protéiques, des anti-microbiens, 0,1% de nitrate de sodium et du colorant bleu pour aliments, médicaments et cosmétiques N. 1.

4.4 Complexe de précipitation DAG-PPT EPO-Trac : réactif lyophilisé

Le sérum de singe anti-chèvre est pré-précipité avec du sérum de chèvre normal et un surfactant, dilué dans un tampon BSA-borate avec des anti-microbiens et 0,03% de thimérosal et lyophilisé. Reconstituez le flacon avec 35 mL d'eau purifiée ; mélangez vigoureusement jusqu'à ce que la suspension soit homogène, puis laissez reposer pendant 30 minutes au moins à température ambiante en remuant de temps en temps. Agitez ou mélangez à l'aide d'un petit vibreur magnétique à très faible vitesse en dispensant le DAG-PPT dans les tubes à essais. Si le réactif semble réhydraté avant l'emploi, ne l'utilisez pas.

4.5 Contrôles EPO-Trac, Degrés 1 et 2 : réactif prêt à l'emploi

L'EPO humaine recombinante est ajoutée à une solution saline tamponnée avec un stabilisateur protéique pour obtenir une concentration comprise dans un intervalle spécifique indiqué sur le certificat d'analyse. 0,1% de nitrate de sodium et d'autres stabilisateurs sont ajoutés.

5. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

Non prévu pour une utilisation interne ou externe sur l'homme ou l'animal.

RÉACTIFS CONTENANT DE L'AZIDE DE SODIUM

ATTENTION : Certains réactifs de cette trousse contiennent du nitrure de sodium. L'azide de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre et former des azotures ultra-explosifs. Pour leur mise au rebut, rincer à grande eau pour empêcher l'accumulation d'azide. Pour plus d'informations, consulter "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," dans le manuel Guide-Safety Management No. CDC-22 publié par les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 1976.

Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/EC)

R 20/21/22 - Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.

R 32 - Un contact avec les acides dégage des gaz très toxiques.

S28 - Après un contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau.

RÉACTIFS CONTENANT DU THIMÉROSAL

Certains réactifs de cette trousse contiennent du thimérosal contenant un composant de mercure. La mise au rebut du mercure élémentaire, du mercure inorganique, des oxydes de mercure et des composés de mercure, doit être effectuée en respectant scrupuleusement les réglementations locales, nationales et fédérales.

AVERTISSEMENT : Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme provoquant des malformations à la naissance et des troubles de la reproduction.

RÉACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 2 μCi (74 kBq) d'iode-125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des vétérinaires pratiquant la médecine vétérinaire, des laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire *in vitro* n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé dans son récipient d'origine à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article de verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles de verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

AVERTISSEMENT : Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme étant cancérigène.

ATTENTION : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

AUTRES AVERTISSEMENTS

1. Evitez les projections d'eau et la génération d'aérosols
2. Si vous appliquez une durée et des températures d'incubation différentes de celles qui sont indiquées, les résultats pourront être erronés.
3. Si les échantillons sont contaminés par des microbes, ils peuvent engendrer des résultats incorrects.
4. Ne remplacez pas les réactifs de cette trousse par des réactifs d'autres lots ou d'autres fabricants.

6. QUALITES REQUISES POUR LES ECHANTILLONS

ATTENTION : Les échantillons des patients et tout le matériel entrant en contact avec ces échantillons doit être considéré comme potentiellement infectieux et mis au rebut en adoptant les précautions nécessaires.

Prélèvement et conservation du sérum ou du plasma

Un échantillon adéquat de sang doit être prélevé par ponction veineuse de manière aseptique dans un tube de verre à vide stérile de 5 à 10 mL, de manière à obtenir une quantité minimum de 400 µL de sérum ou de plasma EDTA à doser (pour 2 répliqués). Séparer soigneusement et rapidement le sérum du caillot par centrifugation afin d'éviter l'hémolyse. Centrifuger le sérum ou le plasma à température ambiante pendant 10 minutes à 760 x g*. L'EDTA (72 mg/5 mL sang) doit être utilisé comme anticoagulant pour le plasma. Aucun autre additif ni conservateur n'est nécessaire pour maintenir l'intégrité de l'échantillon.

Le sérum ou le plasma EDTA doit être placé dans des tubes de conservation stériles couverts. Le sérum est stable jusqu'à 7 jours lorsqu'il est conservé à 4°C. Pour une conservation plus longue, congelez-le à -20°C dans un freezer sans auto-dégivrage. DiaSorin a montré que les échantillons de sérum sont stables jusqu'à 18 mois s'ils sont maintenus constamment congelés à -20°C. Les échantillons de sérum ne doivent pas être congelés et décongelés plusieurs fois. Tous les dispositifs de plastique, de verre ou d'autres matériaux entrant en contact avec l'échantillon doivent être entièrement décontaminés.

Il est conseillé (mais pas nécessaire) d'utiliser des échantillons à jeun, afin d'éviter des interférences imprévues avec des substances solubles dans les lipides. Les échantillons visiblement hémolysés doivent être évités. La bilirubine (<5 mg/dL) n'a pas présenté d'interférence avec ce dosage. Aucun médicament n'a été examiné pour déterminer une éventuelle interférence.

7. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

- 7.1 Gants de caoutchouc / latex à porter pour effectuer le test.
- 7.2 Tubes en verre borosilicaté jetables, 12 x 75 mm.
- 7.3 Centrifugeuse à thermostat (20-25°C) pour tubes 12 x 75 mm tournés à 1600 ±20 g*.
- 7.4 Compteur à scintillation gamma calibré et en mesure de compter l'iode-125.
- 7.5 Agitateur-mélangeur Vortex.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm (rpm)})^2$$

- 7.6 Pipettes
- a. Micropipettes calibrées pour délivrer 200 (± 4) μL .
 - b. Distributeurs à répétition calibrés pour délivrer 100 (± 2) μL et 500 (± 5) μL .
- 7.7 Eau purifiée pour la dilution du DAG-PPT.
- 7.8 Timer pour chronométrer précisément ± 2 minutes.
- 7.9 Papier quadrillé semi-logarithmique à trois cycles.
- 8. PROCÉDURE DE DOSAGE**
- 8.1 Préparer les échantillons à déterminer.
- 8.2 Installer des tubes en verre jetables de 12 x 75 mm étiquetés en doublet selon le Profil de dosage de la dernière page.
- 8.3 Ajouter les réactifs comme suit :
- a. **Tubes d'efficacité totale**
Mettez de côté jusqu'à la sixième étape (utilisé pour les calculs du contrôle de qualité - consultez la section du Contrôle de qualité)
 - b. **Tubes de liaison non spécifique (NSB)**
200 μL d'étalon 0 par tube
 - c. **Etalon 0**
200 μL d'étalon 0 par tube
 - d. **Etalons EPO-Trac (1-5)**
200 μL d'étalon par tube
 - e. **Contrôles et échantillons à déterminer**
200 μL de chaque échantillon ou contrôle par tube
- 8.4 Ajoutez 100 μL d'anticorps primaire de chèvre EPO (bleu) à chaque tube, à l'exception de l'efficacité totale et des tubes NSB.
- 8.5 Agitez délicatement les tubes sur le mélangeur Vortex et laissez incubé pendant 2 heures (± 10 minutes) à température ambiante (20-25°C).
- 8.6 Ajoutez 100 μL de traceur EPO (rouge) à tous les tubes.
- 8.7 Agitez délicatement tous les tubes sur le mélangeur Vortex et laissez incubé pendant 16 à 24 heures à 2-8°C.
- 8.8 Mélangez vigoureusement le DAG-PPT avant de le dispenser. Agitez ou mélangez le DAG-PPT à l'aide d'un petit vibreur magnétique à très faible vitesse en dispensant 500 μL dans les tubes à essais, à l'exception des tubes d'efficacité totale.
- 8.9 Mélangez sur le Vortex puis laissez incubé les tubes pendant 30 (± 5) minutes à température ambiante (20-25°C).
- 8.10 Centrifugez les tubes pendant 20 minutes à 1600 x g* à 20-25°C.
- 8.11 Mettez de côté les tubes à efficacité totale puis faites décanter le surnageant des tubes restant dans un récipient adapté pour les déchets radioactifs. Taper les tubes à l'envers sur du papier absorbant pour retirer les éventuelles gouttes de surnageant qui peuvent rester sur les bords, puis remettez les tubes à l'endroit.
- 8.12 A l'aide d'un compteur à scintillation gamma, comptez le précipité de chaque tube et des tubes d'efficacité totale pendant 1 minute.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm} (\text{rpm}))^2$$

9. COMMENTAIRES SUR LA PROCÉDURE

- 9.1 Ajoutez chaque fraction de réactif dans le tiers inférieur des tubes à essais pour assurer un mélange complet des réactifs.
- 9.2 Si les tubes ne peuvent pas être décantés dans les 5 minutes suivant la centrifugation, ils doivent être à nouveau centrifugés avant de décanter le surnageant.
- 9.3 Pour surveiller complètement la précision constante d'un dosage RIA, il faut parfois vérifier des facteurs supplémentaires. DiaSorin suggère un contrôle régulier des paramètres suivants pour garantir la précision constante de la trousse.
 - a. **Activité totale**
 - b. **Liaison maximale**
Compte moyen par minute (CPM) des tubes d'étalon 0 / Moyenne des CPM des tubes d'efficacité totale.
 - c. **Liaison non spécifique**
Moyenne des CPM des tubes NSB / Moyenne des CPM des tubes d'efficacité totale.
 - d. **Pente de la courbe d'étalonnage**
Surveillez par exemple les points de suppression 80%, 50% et 20% de la ligne d'étalonnage.

10. CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit inclure au moins deux contrôles à chaque dosage pour surveiller la précision du dosage. Des contrôles disponibles dans le commerce ou les deux contrôles de référence fournis avec la trousse peuvent être utilisés. Les contrôles de la trousse contiennent de l'EPO à deux concentrations. Les contrôles de la trousse ont été évalués par DiaSorin avec la trousse DiaSorin EPO-Trac ¹²⁵I RIA. La plage de concentrations pour chaque contrôle est indiquée dans le certificat d'analyse et indique les limites établies par DiaSorin pour les valeurs de contrôle qui peuvent être obtenues dans des séries analytiques fiables. Des tableaux de contrôle qualité doivent être tenus à jour pour suivre la précision des contrôles. Les limites acceptables de précision doivent être déterminées par chaque laboratoire pour chaque niveau de contrôle, d'après des méthodes statistiques conçues pour dépister les erreurs systématiques et aléatoires. Les résultats de contrôle doivent être conformes aux critères d'acceptabilité du laboratoire avant d'être validés en tant que résultats.^{19,20,21}

11. CALCUL DES RÉSULTATS

Il existe de nombreuses méthodes de calcul des résultats des dosages radio-immunologiques. Chacune est basée sur l'obtention d'une courbe d'étalonnage en traçant l'ampleur de la liaison par rapport aux concentrations indiquées pour les étalons. Ce graphe peut être à l'échelle linéaire ou logarithmique. Chacune de ces méthodes donne essentiellement les mêmes valeurs pour les contrôles et les échantillons, même si certains dosages peuvent être mieux "adaptés" à une méthode particulière que d'autres. La méthode de calcul pour le laboratoire de contrôle qualité DiaSorin est % B/B₀ [la quantité de traceur lié à l'échantillon (B), divisé par la quantité du traceur lié à l'étalon zéro (B₀) x 100] (voir l'étape 3 ci-dessous) par rapport à la concentration logarithmique.

- 11.1 Calculez la moyennes des CPM pour chaque étalon, contrôle et échantillon à déterminer.
- 11.2 Soustrayez la moyenne des CPM des tubes de liaison non spécifique (NSB) de tous les comptes.
- 11.3 Divisez les CPM corrigés de chaque étalon, contrôle ou échantillon par les CPM corrigés de l'étalon 0.

$$\% B/B_0 = \frac{\text{CPM de l'étalon ou de l'échantillon inconnu} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM de l'étalon 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

- 11.4 En utilisant du papier semi-logarithmique à trois cycles, tracez le pourcentage B/B₀ pour les étalons EPO-Trac (axe vertical) et la concentration indiquée sur la feuille de spécification du contrôle de qualité (axe horizontal).
- 11.5 Tracez la droite de meilleur ajustement d'un point à l'autre (FIGURE 1).
- 11.6 Interpolez les taux d'érythropoïétine dans les échantillons à déterminer d'après le tracé.
- 11.7 Si l'échantillon à déterminer indique <4,4 mU/mL, la limite du dosage de ce test présente une valeur de <4,4 mU/mL.
- 11.8 Si un échantillon à déterminer est supérieur à l'étalon le plus élevé, il doit être dilué avec l'étalon 0 EPO-Trac Cat. N 23211 et dosé à nouveau. Des dilutions de 1:2 et 1:5 seront suffisantes pour la plupart des échantillons.

12. LIMITES DU DOSAGE

- 12.1 Les résultats de ce dosage doivent être utilisés avec d'autres informations obtenues par examen clinique et par d'autres procédures de diagnostic.
- 12.2 Aucun médicament n'a été testé pour déterminer des interférences éventuelles avec le dosage.

TABLEAU II
DiaSorin EPO-Trac™ RIA Données de l' Échantillon

Tube	CPM (mU/mL)	Moyenne CPM	Moyenne (CPM-NSB) (B)	Pourcent. Liaison (B/T)**	Pourcent. Liaison (B/B ₀)	Conc. (mU/mL)	*Corr. Conc.
Efficacité totale	14 823						
(T)14,270	14 546						
NSB	492						
	447	470		3,2**			
Etalon 0	4 783						
	4 904	4 844	4 374 (B ₀)	33**	100,0	0	
Étalons							
1	4 321						
	4 273	4 297	3 827		87,5	9,0	
2	3 832						
	3 773	3 803	3 333		76,2	19,0	
3	2 896						
	2 920	2 908	2 438		55,7	39,0	
4	1 645						
	1 669	1 657	1 187		27,1	83,0	
5	865						
	932	898	428		9,8	290,0	
Degré de contrôle 1	3 924						
	3 877	3 901	3 431		74,4	16,9	
Degré de contrôle 2	1 918						
	1 935	1 927	1 457		33,3	69,3	
UKN No. 1	1 217						
	1 232	1 225	755		17,3	127	
1:2	1 832						
	1 873	1 853	1 383		31,6	72,6	124,8
UKN No. 2	1 508						
	1 437	1 472	1 002		22,9	96,6	
1:2	2 264						
	2 309	2 286	1 816		41,5	56,0	91,6

Les données typiques de l'échantillon et la courbe d'étalonnage sont présentées dans le TABLEAU II et dans la FIGURE 1 ; ces informations sont fournies à titre de référence seulement et ne doivent pas être utilisées pour le calcul d'une valeur quelconque.

* Conc. corr. = Concentration corrigée ; uniquement pour les échantillons dilués.

** Ces paramètres sont surveillés pour le contrôle qualité (consultez la section Contrôle Qualité).

COURBE D'ETALONNAGE DE L'ETALON EPO

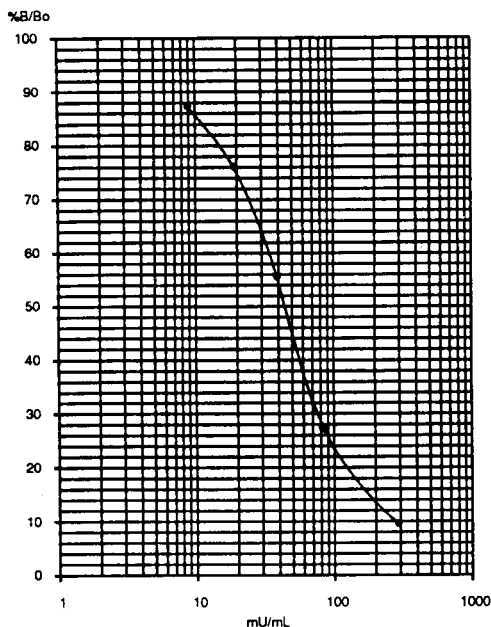


FIGURE 1

* Ce graphique est généré à partir des données de l'échantillon (TABLEAU II) et n'est présenté que comme point de référence. Ne l'utilisez pas pour calculer les valeurs de votre dosage.

13. VALEURS ESCOMPTÉES

13.1 Valeurs normales

CHAQUE LABORATOIRE DOIT ETABLIR SA PROPRE PLAGE DE VALEURS DE REFERENCE.

Le taux d'érythropoïétine dans le plasma a été mesuré chez cent quatre (104) hommes et femmes normaux (45 M, 61 F) à Minneapolis, dans le Minnesota, à l'aide du dosage radio-immunologique EPO-Trac. La valeur moyenne d'EPO a été établie à $17,7 \pm 7,5$ mU/mL. Les valeurs individuelles s'échelonnaient entre un minimum de 4,9 et un maximum de 52,7 mU/mL. La valeur moyenne du sérum EPO pour les femmes normales était 18,3 et pour les hommes normaux elle atteignait 16,6 mU/mL. Aucune différence statistique ($p = 0,27$) n'a été observée entre les taux d'EPO chez les hommes et chez les femmes.

Différents autres examens sur des sujets normaux à l'aide de dosages radio-immunologiques d'EPO internes ont démontré un taux d'EPO semblable en ampleur à l'étude ci-dessus.^{2, 4, 5} Certaines de ces études ont mis en valeur des différences significatives mais légères entre les hommes et les femmes : les femmes présentent des valeurs légèrement plus élevées que les hommes.^{8, 9} Les résultats de ces études sont résumés dans le tableau suivant :

Etude	Sexe	n=	Moyenne \pm 1 Ecart-type
Koeffler 1981 ²	les deux	26	14,9 \pm 4,2 mU/mL
Garcia 1982 ⁴	hommes	364	17,2 \pm 5,5 mU/mL
	femmes	199	18,8 \pm 6,2 mU/mL
Ryner 1989 ⁵	hommes	50	8,0 \pm 3,2 mU/mL
	femmes	50	11,3 \pm 3,4 mU/mL

13.2 Valeurs de l'état de santé

Lorsqu'elle est examinée avec d'autres informations cliniques, la concentration anormale d'EPO en circulation peut être caractéristique de certaines conditions pathologiques.

Les patients atteints de polycythémie vera présentent typiquement un taux de sérum EPO normal ou bas dans le dosage radio-immunologique interne.^{8,9} Les patients atteints de polycythémie vera provoquée par une hypoxie, un dysfonctionnement cardiaque congestif ou une obstruction pulmonaire chronique, présentent un taux d'EPO élevé.^{3,8,9} La production ectopique d'EPO peut parfois provoquer un taux élevé de sérum EPO et donc une polycythémie vera chez les patients présentant un myome utérin, un hémangioblastome cérébral, un carcinome du foie ou un phéochromocytome. Les tumeurs du rein, y compris l'hypernéphrome, l'adénome et le sarcome, peuvent provoquer une érythrocytose semblable liée à l'EPO.²

La plupart des patients anémiques présentent un taux élevé de sérum EPO, bien que l'importance de cette hausse dépende du degré et du type d'anémie. Une élévation du sérum EPO peut apparaître chez les patients atteints d'anémie hématies falciformes ou infectés par le VIH, bien que le taux d'EPO soit en moyenne moins prononcé que dans les autres anémies.^{10,11}

On estime que les anémies dépistées chez les patients atteints de maladies rénales sont provoquées par une déficience de la sécrétion d'érythropoïétine par le rein malade ou absent. Les patients anémiques soumis à dialyse présentent un taux d'EPO faible ou indétectable.¹² D'autre part, les patients dépendant de la dialyse et atteints de maladie rénale en phase terminale présentent habituellement un taux de sérum EPO normal ou élevé. Le taux de sérum EPO relevé chez ces patients est pourtant considéré comme trop bas pour leur degré d'anémie.^{12,13} Les patients ayant récemment subi une transplantation de rein présentent parfois un taux de sérum EPO élevé, en réponse à leur anémie.¹⁴

Dans l'étude clinique conduite à Minneapolis, dans le Minnesota, le taux d'EPO a été mesuré par le dosage radio-immunologique EPO-Trac chez vingt-huit (28) patients néphriques soumis à dialyse et présentant une maladie rénale en phase terminale. Le taux de sérum EPO avoisinait $38,4 \pm 67,1$ mU/mL (intervalle : 10,4-360,6 mU/mL), tandis que le taux d'hémoglobine atteignait $9,4 \pm 1,6$ g/dL (intervalle : 6,9 à 12,3 g/dL). Cette valeur était considérée comme anormalement basse pour une population de patients présentant une anémie de degré équivalent et une fonction rénale normale.^{12,15} Cette étude a confirmé les résultats obtenus par les chercheurs précédents quant à la déficience d'érythropoïétine relative chez les patients dépendant de la dialyse.^{15,16} De plus, le taux d'érythropoïétine était déterminé dans un certain nombre de groupes de patients. Le tableau suivant présente le taux d'EPO moyen mesuré. Les contrôles des patients étaient sélectionnés de manière aléatoire dans la population de patients évalués.

Tableau résumant la moyenne du taux d'EPO dans les différents groupes de patients à l'aide de la trousse de dosage radio-immunologique EPO-Trac

Diagnosis	n	Moyenne EPO (mU/mL)	Ecart-type
Normaux	36	15,7	10,5
Contrôles des patients	18	18,6	11,3
Patients soumis à dialyse	28	38,4	67,1
Myélodysplasie	2	651,0	887,2
Myélofibrose	2	116,0	147,5
Hypoplasie/Aplasie érythrocytaire	4	1545	1213
Lymphome de Non-Hodgkin	15	26,4	13,8
Maladie d'Hodgkin	3	29,8	31,3
Leucémie lymphoïde chronique	3	17,4	9,7
Macroglobulinémie	2	30,2	15,1
Myélome	3	49,7	52,3
Anémie hémolytique	3	51,4	29,2
Anémies diverses	10	32,2	18,9
Patients atteints d'érythrocytose	6	14,6	8,5
Patients atteints de Polycythémie Vera	6	20,7	4,9

Les taux d'érythropoïétine présentés ci-dessus pourraient correspondre ou non aux pathologies citées. Tous les patients se trouvaient à différents stades d'un traitement pouvant altérer le taux d'érythropoïétine attendu pour leur pathologie spécifique. Considérez toujours l'état du patient et la santé de son système d'érythropoïétine lorsque vous interprétez son taux spécifique d'érythropoïétine.

14. DONNEES CONCERNANT LES PERFORMANCES

14.1 Reproductibilité

Variation intra-essai Sérum (Valeurs = mU/mL)

	Valeur moyenne	Ecart-type	%C.V.**	N
BAS	11,1	1,3	11,9	20
BAS	12,4	1,2	10,0	20
BAS	22,9	1,2	5,2	10
MOYEN	39,9	1,9	4,8	10
ELEVE	106,5	5,1	4,8	10
ELEVE	254,6	29,8	11,7	20

Variation entre les essais Sérum (Valeurs = mU/mL)

	Valeur moyenne	Ecart-type	%C.V.**	N
BAS	9,8	1,4	14,3	5
BAS	13,2	1,6	12,1	5
BAS	19,0	1,3*	6,7	5
MOYEN	40,9	1,4	3,5	5
ELEVE	147,6	15,7	10,6	5
ELEVE	220,2	26,9	12,2	5

* Les échantillons ont été dosés dans cinq essais séparés (n = 5)

** % écart-type = (écart-type ÷ Moyenne) 100

14.2 EXACTITUDE : L'EXACTITUDE DU DOSAGE A ETE VERIFIEE PAR LES TESTS DE LINEARITE ET DE RECUPERATION.

Parallélisme de dilution

Etude de dilution en série d'échantillons de sérum à déterminer

Échantillon	Dilution	EPO Moyenne (mU/mL)	% moyenne / Moyenne de dilution 0
1	0	15,6*	–
	1:2	17,4	111,5
2	0	127,1	–
	1:2	124,8	98,2
	1:4	141,2	111,1
	1:8	152,0	119,6
3	0	96,6	–
	1:2	91,6	94,8
	1:4	100,0	103,9
	1:8		103,5
4	0	51,3	–
	1:2	52,8	102,9
	1:4	38,4	74,9
			Moyenne = 102,3

* Des valeurs de dilution zéro ont été mesurées avant la dilution à l'aide du diluent de sérum DiaSorin.

Exactitude

Etude de récupération

Sérum (Valeurs = mU/mL)

Lot N° 1	Référence*	Etalon EPO ajouté	Valeur mesurée**	Pourcentage de récupération***
1	8,9	19,5	27,3	94,4
	8,9	41,5	51,9	103,6
	8,9	145,0	182,0	119,4
2	18,1	19,5	37,3	98,5
	18,1	41,5	66,0	115,4
	18,1	145,0	205,6	129,3
3	44,3	19,5	62,9	95,4
	44,3	41,5	87,6	104,3
	44,3	145,0	158,5	78,8
4	80,8	19,5	101,3	105,1
	80,8	41,5	127,1	111,6
	80,8	145,0	210,7	89,6
				Mean = 103,8

* Valeur de l'échantillon dosé divisée par 2.

** Volume égal des étalons EPO-Trac 3, 4 et 5, et échantillon du patient combinés.

*** %Récupération = [(mesuré-référence)/EPO ajoutée] x 100

14.3 Sensibilité analytique (limites de détection)

La concentration minimum détectable d'EPO est 4,4 mU/mL, lorsqu'elle est définie comme la concentration apparente de 3 déviations d'étalon des comptes à liaison maximum ou zéro. Les échantillons à déterminer inférieurs à la sensibilité de ce dosage doivent être reportés comme <4,4 mU/mL.

14.4 Spécificité analytique

Les résultats d'une expérience de réaction croisée à l'aide du système de dosage radio-immunologique EPO-Trac et de 8 protéines du sérum naturellement nécessaires ont affiché <une réaction croisée de 0,001% lorsqu'ils étaient mesurés à la sensibilité de l'essai (4,4 mU/mL).

Substances	% Réaction croisée
Albumine humaine	<0,001
Colonie de macrophages granulocytaires facteur de stimulation (GM-CSF)	<0,001
Interleukin-3	<0,001
Alpha-1 antitrypsine	<0,001
Chorio-gonadotrophine humaine	<0,001
Alpha-1 glycoprotéine acide	<0,001
IgG humaine	<0,001
IgM humaine	<0,001

La séquence de gènes de l'érythropoïétine a été comparée à toutes les séquences de gènes humaines dans les bases de données Genbank et EMBL. La recherche n'a trouvé aucun gène ressemblant de manière significative à la séquence de gènes d'érythropoïétine.

14.5 Interférence

Des études ont été évaluées selon les méthodes CLSI pour déterminer l'interférence entre l'hémoglobine, le triglycéride et la bilirubine. Ces études n'ont indiqué aucune interférence.

14.6 Type d'échantillon

Des paires d'échantillon de plasma EDTA et de sérum ont affiché une corrélation importante.

Y (SERUM) = $0,9 + 0,993$ (PLASMA) ; $r = 0,93$ (intervalle : 4,7 – 42,5 mU/mL; sérum).

VOIR LA DERNIÈRE PAGE POUR RÉFÉRENCE

EPO-Trac ¹²⁵I RIA KIT

1. VERWENDUNGSZWECK

NUR ZUR *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK

Das EPO-Trac™ RIA-Kit ist zur quantitativen Bestimmung von Erythropoietin (EPO) im Serum oder EDTA-Plasma durch Radioimmunoassay (RIA) als Hilfsmittel bei der Diagnose von Anämien und Polyzythämien vorgesehen.

2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Erythropoietin (EPO) ist ein Glykoproteinhormon (34.000 Daltons), das die Reife der Thrombozyten-Vorläuferzellen stimuliert. EPO wird durch die Niere in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt des Blutes erzeugt. Wenn die Sauerstoffkonzentrationen fallen, beispielsweise bei einer physiologischen Hypoxie, steigt normalerweise der EPO-Spiegel im Blutkreislauf und stimuliert die Produktion roter Blutzellen.¹

Anormale Konzentrationen des EPOs im Blut sind charakteristisch für spezifische pathologische Störungen, beispielsweise Anämien, Polyzythämien und Tumore. Die Überproduktion von EPO wird mit Nierenkrebs in Verbindung gebracht. Einige Lebertumore und andere Organtumore werden mit der ektopischen Erythropoietin-Produktion in Zusammenhang gebracht.²

Anämie ist eine unzureichende Konzentration von Thrombozyten.² Anämische Patienten mit höheren EPO-Spiegeln leiden beispielsweise an aplastischer Anämie, Eisenmangelanämie und hämolytischer Anämie. Die Anämie durch chronisches Nierenversagen ist eine Folge der unzureichenden EPO-Produktion durch die Niere.

Die Überproduktion von Thrombozyten wird Polyzythämie genannt. Bei unbehandelter primärer Polyzythämie tritt die Überproduktion von Thrombozyten durch hämopoetische Vorläuferzellen bei zu niedrigen oder nicht erkennbaren EPO-Konzentrationen auf.³

Sekundäre (Stress-)Polyzythämie wird durch erhöhte Produktion und Freisetzung von EPO verursacht, die zur Erhöhung der Masse der Thrombozyten führt. Sekundäre Polyzythämie kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden, beispielsweise durch Rauchen, Nierensteine, Lungenfibrose, Herzerkrankungen, Tumore oder defektes Hämoglobin.²

Es wurden verschiedene Verfahren entwickelt, um den Erythropoietin-Spiegel bei Mensch und Tier zu messen. Zu den zuerst entwickelten Assay-Tests gehörte ein *in-vivo*-Bioassay bei *ex-hypoxischen*, polyzythämischen lebenden Mäusen.^{4,5} Mit der Entwicklung von rekombinantem humanem Erythropoietin wurden auch *in-vitro*-Tests entwickelt, die weniger zeitaufwändig und weniger kostspielig sind. Zu diesen *in-vitro*-Tests gehört unter anderem der Radioimmunoassay (RIA) und der Enzym-Immunoassay (EIA).

3. TESTPRINZIP

Bei dem von DiaSorin entwickelten EPO-Trac ¹²⁵I RIA-Verfahren handelt es sich um einen kompetitiven Bindungs- und Ungleichgewichts-Radioimmunoassay, bei dem rekombinantes humanes Erythropoietin sowohl für den Tracer als auch für die Kalibratoren verwendet wird. Die Proben werden mit dem EPO-Trac-Primär-Ziegenantikörper (Ziegenanti-EPO) inkubiert und dürfen zwei Stunden lang miteinander reagieren, danach wird der mit radioaktivem Jod-125 markierte EPO-Trac-Tracer zugesetzt. Nach einer Übernachtinkubation wird der sekundäre Antikörper des Esel-Antiziegen-Präzipitations-Komplexes (DAG-PPT) den Teströhrchen für diesen Test zugesetzt (TABLE I). Bei DAG-PPT handelt es sich um ein Esel-Antiziegen Serum, das mit einem Netzmittel und normalem Ziegen Serum vorab ausgefällt wird. Das DAG-PPT wird mit Kalibratoren bzw. Proben, Primärantikörpern und Tracer 30 Minuten lang inkubiert, danach werden die Teströhrchen in die Zentrifuge gegeben, um den gebundenen vom nicht gebundenen Tracer zu trennen. Der nicht gebundene Tracer wird durch Abgießen des Überstands aus jedem Teströhrchen entfernt. Der gebundene Tracer in den verbleibenden DAG-PPT-Komplexpellets wird mit einem Gammazähler eine Minute lang ausgezählt. Die ¹²⁵I-Anzahl der Zählpulse verhält sich umgekehrt proportional zur Menge des in jeder Probe vorhandenen EPOs.

4. REAGENZEN DES KITS

EPO-Trac-Primärantikörper (BLAU)	1 Fläschchen/11 mL
EPO-Trac-Kalibratoren (0-5)	1 Fläschchen/11 mL, 5 Fläschchen/ 2,1 mL
EPO-Trac-DAG-PPT	2 Fläschchen/35 mL
EPO-Trac-Tracer (ROT)	1 Fläschchen/11 mL
EPO-Trac-Kontrollen	2 Fläschchen/2,1 mL
Anzahl der Tests	100

LAGERUNG: Das Kit sollte bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Nach dem Öffnen jedes Reagenz bei 2–8 °C nicht länger als bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum lagern. Die Reagenzien dürfen nach dem Verfallsdatum nicht verwendet werden. Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem äußeren Etikett angebracht und entspricht dem Verfallsdatum des Tracers.

Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

4.1 EPO-Trac-Kalibratoren, 0-5: Einsatzbereites Reagenz

Es werden sechs rekombinante Erythropoietin-Kalibratoren mit Nennkonzentrationen zwischen etwa 0 bis 280 mU/mL in gepufferter Kochsalzlösung mit Protein stabilisatoren, antimikrobiellen Zusätzen und 0,1 % Natriumazid vorverdünnt. Die Kalibratoren sind geeicht entsprechend dem Standard 2. IRP Erythropoietin, HUM, Urinary/Bioassay 67/343 der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ⁶ und den internationalen Standard der WHO International Calibrator for Erythropoietin, Recombinant DNA (rDNA) – Abgeleiteter Code #87/684. Die Kalibratoren des Kits sind mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische In-vitro-Test wie empfohlen durchgeführt wird.

4.2 ¹²⁵I EPO-Trac: Einsatzbereites Reagenz

Das humane rekombinante Erythropoietin wird mit radioaktivem Jod-125 (2 µCi (74 kBq)) markiert und in einer Kochsalzpufferlösung mit Protein stabilisatoren, antimikrobiellen Zusätzen, 0,1 % Natriumazid sowie dem roten Farbstoff Nr. 40 für Nahrungsmittel, Medikamente und Kosmetika (FD & C) verdünnt.

4.3 EPO-Trac-Primärantikörper: Einsatzbereites Reagenz

Das Ziegen-Antihuman-EPO-Serum wird mit gepufferter Kochsalzlösung, mit Protein stabilisatoren, antimikrobiellen Zusätzen, 0,1 % Natriumazid und dem blauen FD & C-Farbstoff Nr. 1 verdünnt.

4.4 EPO-Trac-Präzipitations-Komplex, DAG-PPT: Lyophilisiertes Reagenz

Das Esel-Antiziegenserum wird durch normales Ziegenserum und Netzmittel vorab ausgefällt, in einem BSA-Boratpuffer mit antimikrobiellen Zusätzen und 0,03 % Thimerosal verdünnt und anschließend lyophilisiert. Das Fläschchen mit 35 mL gereinigtem Wasser rekonstituieren; gründlich mischen, bis die Suspension homogen erscheint, und dann mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen und hin und wieder schütteln. Mit einem kleinen magnetischen Rühr- oder Mischgerät mit sehr niedriger Drehzahl mischen und dabei DAG-PPT in die Teströhrchen geben. Wenn das Reagenz vor der Verwendung Anzeichen einer Rehydratation aufweist, das Reagenz nicht verwenden.

4.5 EPO-Trac-Kontrollen, Kontroll-Ebenen 1 und 2: Einsatzbereites Reagenz

Der gepufferten Kochsalzlösung mit Protein stabilisator wird humanes rekombinantes EPO zugesetzt, um eine Konzentration innerhalb des auf dem Analysenzertifikat angegebenen spezifischen Bereichs einzustellen. Es werden 0,1 % Natriumazid und andere Stabilisatoren zugesetzt.

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK

Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren.

REAGENZIEN MIT NATRIUMAZID

ACHTUNG: Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid, das ggf. mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und höchst explosive Metallazide bilden kann. Zur Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen, um Azidbildung zu vermeiden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" des Handbuchs "Safety Management", Nr. CDC-22, herausgegeben von den Centers for Disease Control and Prevention in Atlanta (Georgia), USA, im Jahr 1976.

Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe der Europäischen Gemeinschaft (Richtlinie 1999/45/EG)

R 20/21/22 – Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und bei Kontakt mit der Haut.

R 32 – Entwickelt bei Kontakt mit Säure sehr giftige Gase.

S28 – Bei Kontakt mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

THIMEROSALHALTIGE REAGENZIEN

Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Thimerosal, das unter anderem auch eine Quecksilberverbindung enthält. Die Entsorgung von elementarem Quecksilber, anorganischen Quecksilberverbindungen, Quecksilberoxyden und Quecksilberverbindungen darf nur unter absoluter Berücksichtigung aller lokalen, staatlichen und Ländervorschriften erfolgen.

ACHTUNG: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Erkenntnissen des Staates Kalifornien zu Schäden des Erbgutes sowie zu Missbildungen führen kann.

REAGENZIEN MIT JOD-125

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit höchstens 2 µCi (74 kBq) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Dieses radioaktive Material darf nur von Ärzten, praktizierenden Tierärzten, klinischen Laboren oder Krankenhäusern und nur für klinische *in-vitro*-Tests oder *in-vitro*-Labortests, bei denen das Material oder dessen Strahlung keinen Menschen oder Tieren intern oder extern verabreicht wird, empfangen, erworben, besessen und verwendet werden. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.

3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und den Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung wischen. Alle benutzten Glasbehälter gründlichst mit Wasser spülen, bevor sie mit anderen Laborbehältern aus Glas zusammen ausgewaschen werden.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

VORSICHT: Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien krebserregend ist.

WICHTIGER HINWEIS: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen geringfügig abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität des Kits angibt.

WEITERE WARNHINWEISE

1. Verspritzen und Erzeugung von Aerosolen vermeiden.
2. Werden die angegebenen Inkubationszeiten bzw. Inkubationstemperaturen nicht eingehalten, kann es zu Messfehlern kommen.
3. Bei mikrobieller Verunreinigung der Reagenzien kann es zu Messfehlern kommen.
4. Die Reagenzien nicht durch Reagenzien aus anderen Chargen oder von anderen Herstellern ersetzen.

6. ANFORDERUNGEN AN DIE PROBEN

VORSICHT: Patientenproben und alle Materialien, die Kontakt mit dem Patientenproben haben, sollten als potenziell infektiös behandelt und unter Einhaltung der jeweiligen Sicherheitsvorkehrungen entsorgt werden.

ENTNAHME UND LAGERUNG VON SERUM ODER PLASMA

Eine entsprechende Blutprobe sollte aseptisch durch Venenpunktur entnommen und in einem evakuierten sterilen Glasröhrchen von 5 oder 10 mL gesammelt werden, um mindestens 400 µL Serum oder EDTA-Plasma pro Test (für zwei Replikate) zu erhalten. Es ist insbesondere darauf zu achten, dass das Serum unmittelbar nach der Entnahme aus der Zentrifuge vom Gerinnsel getrennt wird, um eine Hämolyse zu vermeiden. Das Serum oder Plasma bei Raumtemperatur 10 Minuten mit $760 \times G^*$ zentrifugieren. EDTA (72 mg/5 mL Blut) sollte als Antikoagulans für Plasma verwendet werden. Es sind keine weiteren Zusatzstoffe oder Konservierungsstoffe nötig, um die Unversehrtheit der Proben zu erhalten.

Das Serum bzw. EDTA-Plasma in steril abgedeckten Lagerröhrchen aufbewahren. Das Serum ist bei 4 °C bis zu sieben Tage stabil. Für längere Aufbewahrungszeiten bei -20 °C in einem nicht selbstauftauenden Einfriergerät einfrieren. Nach Untersuchungen von DiaSorin sind die Serumproben bei ständiger Lagerung bei -20 °C bis zu 18 Monate stabil. Serumproben nicht wiederholt einfrieren und auftauen. Alle Kunststoffteile, Glasteile und sonstige Materialien, die Kontakt mit den Proben haben, müssen frei von jeglichen Verunreinigungen sein.

Die Befestigung der Proben wird empfohlen, ist jedoch nicht unbedingt erforderlich. Damit werden unerwünschte Störungen durch fettlösliche Substanzen vermieden. Proben, bei denen eine Hämolyse deutlich erkennbar ist, dürfen nicht verwendet werden. Bilirubin (<5 mg/dL) stört diesen Test nachweislich nicht. Es wurde nicht untersucht, ob Medikamente diesen Test stören.

7. AUSRÜSTUNG UND MATERIALIEN, DIE NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN SIND

- 7.1 Bei Durchführung dieses Tests Gummi- oder Latexhandschuhe tragen.
- 7.2 Einweg-Borosilikatglasröhrchen, 12 × 75 mm
- 7.3 Zentrifuge mit Temperaturregelungen (20-25 °C) für 12 × 75 mm Röhrchen, die bei 1600 ± 20 G* zentrifugiert werden.
- 7.4 Kalibrierter Gammazintillationszähler zur Auszählung von radioaktivem Jod-125
- 7.5 Schüttelmischer
- 7.6 Pipettiergeräte:
 - a. Mikropipettoren für 200 (±4) µL
 - b. Mehrfachspender für 100 (±2) µl und 500 (±5) µL
- 7.7 Gereinigtes Wasser zur Verdünnung des DAG-PPT
- 7.8 Zeitgeber zur exakten Bestimmung der Zeit auf ±2 Minuten
- 7.9 Dreizüdiges halblogarithmisches Millimeterpapier

8. TESTABLAUF

- 8.1 Unbekannte Proben vorbereiten.
- 8.2 Markierte 12 × 75 mm Einweg-Glasröhrchen in Zweierreihen aufstellen (siehe Testplan auf der Rückseite).
- 8.3 Die Reagenzien wie folgt zugeben:
 - a. **Röhrchen für die Gesamtzählung**
Für Schritt 6 zur Seite stellen (für die Berechnung der Qualitätskontrollen, siehe Abschnitt Qualitätskontrolle)
 - b. **Nichtspezifische Bindungs-Röhrchen (NSB)**
200 µl Nullkalibrator pro Röhrchen
 - c. **Nullkalibrator**
200 µl Nullkalibrator pro Röhrchen
 - d. **EPO-Trac-Kalibratoren (1-5)**
200 µl Kalibrator pro Röhrchen
 - e. **Kontrollen und unbekannte Proben**
200 µl Probe oder Kontrolle pro Röhrchen
- 8.4 Jedem Röhrchen 100 µL EPO-Primär-Ziegenantikörper (blau) zusetzen, mit Ausnahme des NSB-Röhrchens und des Gesamtzählröhrchens.
- 8.5 Die Röhrchen vorsichtig schütteln und 2 Stunden (±10 Minuten) bei Zimmertemperatur (20-25 °C) inkubieren.
- 8.6 Allen Röhrchen 100 µl EPO-Tracer (rot) zusetzen.
- 8.7 Die Röhrchen vorsichtig schütteln und 16-24 Stunden bei 2-8 °C inkubieren.
- 8.8 Vor der Zugabe des DAG-PPT die Flasche gründlich schütteln. Das DAG-PPT mit einem kleinen magnetischen Rühr- oder Mischgerät mit sehr niedriger Drehzahl mischen und davon allen Röhrchen mit der Ausnahme der Röhrchen für die Gesamtzählung 500 µL zusetzen.
- 8.9 Die Röhrchen schütteln und anschließend für 30 (±5) Minuten bei Zimmertemperatur (20-25 °C) inkubieren.
- 8.10 Die Röhrchen für 20 Minuten bei 20-25 °C mit 1600 × G* zentrifugieren.
- 8.11 Die Röhrchen für die Gesamtzählung zur Seite stellen. Den Überstand von den übrigen Röhrchen in einen geeigneten Behälter für radioaktiven Abfall dekantieren. Die Röhrchen umgedreht auf Saugpapier abtropfen lassen, um alle eventuell am Rand verbliebenen Resttropfen des Überstands zu entfernen, bevor die Röhrchen über Nacht zum Trocknen aufrecht hingestellt werden.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{Radius in cm}) (U/\text{min})^2$$

- 8.12 Mit einem Gammazintillationszähler den Niederschlag in jedem Röhrchen und den Röhrchen für die Gesamtzählung eine Minute lang auszählen.

9. HINWEISE ZUM VERFAHREN

- 9.1 Jedes Reagenz-Aliquot in das untere Drittel der Teströhrchen einfüllen, um ein vollständiges Vermischen der Reagenzien zu gewährleisten.
- 9.2 Wenn die Röhrchen nicht innerhalb von 5 Minuten nach der Entnahme aus der Zentrifuge dekantiert werden können, müssen die Röhrchen vor dem Abgießen des Überstands erneut zentrifugiert werden.
- 9.3 Für die vollständige Überwachung der konsistenten Leistung eines RIA müssen weitere Faktoren überprüft werden. DiaSorin empfiehlt, die folgenden Parameter regelmäßig zu überprüfen, um eine konsistente Leistung des Kits sicherzustellen.
- Gesamtzählung**
 - Maximale Bindung**
Durchschnittliche Zählimpulse pro Minute (CPM) der Nullkalibrorröhrchen/
Durchschnittliche CPM der Röhrchen für die Gesamtzählung.
 - Nichtspezifische Bindung**
Durchschnittliche CPM der NSB-Röhrchen/Durchschnittliche CPM der
Röhrchen für die Gesamtzählung.
 - Steigung der Kalibrator Kurve**
Zum Beispiel, Überwachung der Suppressionspunkte der Kalibratorlinie bei
80 %, 50 % und 20 %.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Bei jedem Test muss das Labor mindestens zwei Kontrollen vorsehen, um die Leistung des Tests zu kontrollieren. Es können handelsübliche Kontrollen oder die zwei Referenzkontrollen aus dem Kit verwendet werden. Die Kitkontrollen enthalten EPO in zwei Konzentrationen. Die Kitkontrollen wurden von DiaSorin mit dem DiaSorin EPO-Trac^{125I} RIA-Kit getestet. Der Konzentrationsbereich jeder Kontrolle ist auf dem Analysenzertifikat angegeben; er gibt die Grenzen an, die von DiaSorin für Kontrollwerte festgelegt wurden, die in zuverlässigen Testdurchgängen erhalten werden können. Um die Leistung der Kontrollen zu überwachen, sollten Qualitätskontrolltabellen geführt werden. Jedes Labor sollte die akzeptablen Leistungsgrenzen für jede Kontrollebene mit Hilfe statistischer Verfahren selbst festlegen, um sowohl systematische als auch zufällige Fehler zu erkennen. Die Kontrollergebnisse müssen den Akzeptabilitätskriterien des Labors entsprechen, bevor die Testergebnisse des Patienten mitgeteilt werden können.^{19,20,21}

11. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Es gibt viele Möglichkeiten, die Ergebnisse von Radioimmunoassays zu berechnen. Bei jeder Methode wird eine Kalibrator Kurve angelegt, indem die prozentualen Bindungen gegen die angegebenen Konzentrationen der Kalibrations-Kalibratoren aufgetragen werden. Die Kurve kann entweder eine lineare oder eine logarithmische Skala haben. Jede dieser Methoden führt im Wesentlichen zu denselben Werten für Kontrollen und Proben; bei einigen Assays ist die eine Methode jedoch möglicherweise besser geeignet als die andere. Die Berechnungsmethode für das DiaSorin Quality Control Laboratory lautet: % B/B₀ [von der Probe gebundene Tracermenge (B), dividiert durch die vom Nullkalibrator gebundene Tracermenge (B₀) x 100] (siehe folgender Schritt 3) in Abhängigkeit zum Logarithmus der Konzentration.

- 11.1 Die durchschnittliche CPM für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und jede unbekannte Probe berechnen.
- 11.2 Die durchschnittliche CPM der NSB-Röhrchen von allen Zählungen substrahieren.
- 11.3 Die korrigierte CPM jedes Kalibrators, jeder Kontrolle und jeder Probe durch die korrigierte CPM des Nullkalibrators dividieren.

$$\% B/B_0 = \frac{\text{CPM des Kalibrators oder der unbekanntes Probe} - \text{CPM der NSB}}{\text{CPM des Nullkalibrators} - \text{CPM der NSB}} \times 100$$

- 11.4 Trage Sie auf dreizügigem halblogarithmischem Millimeterpapier den prozentualen Anteil des B/B_0 für die EPO-Trac-Kalibratoren (Y-Achse) in Abhängigkeit zur Konzentration (X-Achse) ein, die im Bericht für die Qualitätskontrolle angegeben ist.
- 11.5 Ziehen Sie eine Ausgleichsline durch die Punkte (ABBILDUNG 1).
- 11.6 Interpolieren Sie die Erythropoietin-Werte der unbekanntes Proben aus der grafischen Darstellung.
- 11.7 Wenn für eine unbekanntes Probe als Wert $<4,4$ mU/mL gemessen wird, d. h. die Nachweisgrenze für diesen Test, geben Sie diesen Wert als $<4,4$ mU/mL an.
- 11.8 Falls der Wert einer unbekanntes Probe größer als der höchste Kalibrator ist, diese Probe mit EPO-Trac-Nullkalibrator, Kalibrator-Nr. 23211 verdünnen und neu testen. Für die meisten Proben sind Verdünnungen von 1:2 und 1:5 ausreichend.

12. GRENZEN DES VERFAHRENS

- 12.1 Die Ergebnisse dieses Tests sind im Zusammenhang mit den aus der klinischen Untersuchung und anderen Diagnoseverfahren verfügbaren Informationen zu betrachten.
- 12.2 Es wurde nicht untersucht, inwieweit Medikamente den Test stören.

TABELLE II
DiaSorin EPO-Trac™ RIA ProbenDaten

Röhrchen	CPM (mU/mL)	Durchschnittl. CPM	Durchschnittl. (CPM-NSB) (B)	Prozent. gebunden (B/T)**	Prozent. gebunden (B/B ₀)	Konc. (mU/mL)	*Korr. Konc.
Gesamte gezählte Impulse (T)14,270	14.823						
NSB	492						
	447	470		3,2**			
Nullkalibrator	4.783						
	4.904	4.844	4.374 (B ₀)	33**	100,0	0	
Kalibratoren							
1	4.321						
	4.273	4.297	3.827		87,5	9,0	
2	3.832						
	3.773	3.803	3.333		76,2	19,0	
3	2.896						
	2.920	2.908	2.438		55,7	39,0	
4	1.645						
	1.669	1.657	1.187		27,1	83,0	
5	865						
	932	898	428		9,8	290,0	
Kontrollebene 1	3.924						
	3.877	3.901	3.431		74,4	16,9	
Kontrollebene 2	1.918						
	1.935	1.927	1.457		33,3	69,3	
UKN-Nr. 1	1.217						
	1.232	1.225	755		17,3	127	
1:2	1.832						
	1.873	1.853	1.383		31,6	72,6	124,8
UKN-Nr. 2	1.508						
	1.437	1.472	1.002		22,9	96,6	
1:2	2.264						
	2.309	2.286	1.816		41,5	56,0	91,6

Typische ProbenDaten und eine Kalibratorkurve finden Sie in TABELLE II und ABBILDUNG 1; diese Informationen dienen nur als Referenz und dürfen nicht zur Berechnung von Werten verwendet werden.

* Korr. Konz. = Korrigierte Konzentration; nur für verdünnte Proben.

** Diese Parameter werden zum Zweck der Qualitätskontrolle überwacht (siehe Abschnitt Qualitätskontrolle).

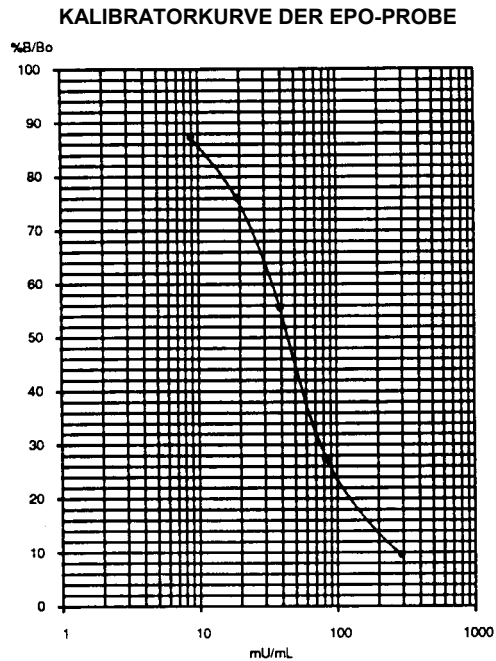


ABBILDUNG 1

* Dieser Graph wird aus den Probanddaten (TABELLE II) erstellt und dient nur als Referenz. Nicht zur Berechnung der eigenen Testwerte verwenden.

13. ERWARTETE WERTE

13.1 Normalbereich

JEDES LABOR SOLLTE SEINEN EIGENEN NORMALBEREICH ERMITTELN.

Die Erythropoietin-Spiegel im Serum wurden bei 104 normal gesunden männlichen und weiblichen Personen (45 Männer, 61 Frauen) aus Minneapolis (Minnesota) mit dem EPO-Trac RIA gemessen. Der durchschnittliche EPO-Wert lag bei $17,7 \pm 7,5$ mU/mL. Die Einzelwerte lagen zwischen 4,9 und 52,7 mU/mL. Der durchschnittliche EPO-Wert im Blut bei Frauen lag normalerweise bei 18,3 und bei Männern bei 16,6 mU/mL. Zwischen den EPO-Spiegeln der Männer und Frauen ließ sich keine statistische Differenz ($p = 0,27$) feststellen.

Verschiedene andere Untersuchungen an gesunden Personen mit hausüblichen EPO RIAs ergaben ähnliche durchschnittliche EPO-Spiegel wie in der oben genannten Studie.^{2, 4, 5} Bei einigen dieser Studien wurden signifikante, aber geringfügige Differenzen zwischen Männern und Frauen festgestellt, wobei bei Frauen leicht höhere Werte als die Männer aufwiesen.^{8,9} Die Ergebnisse dieser Studie sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Studie	Geschlecht	n=	Mittelwert \pm 1 SA
Koeffler 1981 ²	beide	26	$14,9 \pm 4,2$ mU/mL
Garcia 1982 ⁴	Männer	364	$17,2 \pm 5,5$ mU/mL
	Frauen	199	$18,8 \pm 6,2$ mU/mL
Ryner 1989 ⁵	Männer	50	$8,0 \pm 3,2$ mU/mL
	Frauen	50	$11,3 \pm 3,4$ mU/mL

13.2 Werte bei Krankheitsstadien

Anormale EPO-Konzentrationen im Blutkreislauf können im Zusammenhang mit weiteren klinischen Informationen ein deutlicher Hinweis auf spezifische Erkrankungen sein.

Patienten mit primärer Polyzythämie zeigten typischerweise normale oder niedrigere EPO-Spiegel im Blut, wenn diese mit den hausüblichen RIAs gemessen wurden.^{8,9} Patienten mit sekundärer Polyzythämie bedingt durch Hypoxie, z. B. durch dekompensierte Herzinsuffizienz oder chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen, zeigten höhere EPO-Spiegel.^{3,8,9} Die ektopische EPO-Produktion kann mitunter die Folge höherer EPO-Spiegel im Blut und einer darauf folgenden sekundären Polyzythämie bei Patienten mit Uterusmyom, Kleinhirn-Hämangioblastom, Leberkarzinom oder Phäochromozytom sein. Nierentumore, beispielsweise Hypernephrome, Adenome und Sarkome können in ähnlicher Weise zu EPO-bedingter Erythrozytose führen.²

Bei den meisten Anämiepatienten zeigten sich höhere EPO-Spiegel, wobei die Erhöhung von Art und Grad der Anämie abhängt. Höhere EPO-Spiegel im Blut können auch bei Patienten festgestellt werden, die an Sichelzellenanämie leiden oder sich mit HIV infiziert haben, obwohl die EPO-Spiegel im Durchschnitt weniger deutlich verändert sind als bei anderen Anämien.^{10,11}

Die bei Patienten mit Nierenerkrankungen festgestellten Anämien sind vermutlich durch die unzureichende Erythropoietin-Produktion durch erkrankte oder fehlende Nieren bedingt. Anephrotische, anämische Dialysepatienten haben niedrige oder nicht erkennbare EPO-Spiegel.¹² Andererseits haben auf die Dialyse angewiesene Patienten im Endstadium der Nierenerkrankung in der Regel normale oder leicht erhöhte EPO-Spiegel im Blut. Bei diesen Patienten sind die EPO-Spiegel im Blut jedoch für den Grad ihrer Anämie zu niedrig.^{12,13} Patienten mit einer kürzlich durchgeführten Nierentransplantation haben mitunter höhere EPO-Spiegel im Blut infolge ihrer Anämie.¹⁴

Bei einer klinischen Studie in Minneapolis (Minnesota) wurden die EPO-Spiegel durch EPO-Trac RIA bei achtundzwanzig (28) nephrotischen Dialysepatienten im Endstadium der Nierenerkrankung gemessen. Die EPO-Spiegel im Serum lagen im Durchschnitt bei $38,4 \pm 67,1$ mU/mL (Bereich: 10,4–360,6 mU/mL) und die Hämoglobinspiegel lagen bei $9,4 \pm 1,6$ g/dL (Bereich: 6,9–12,3 g/dL). Dieser Wert war für eine Patientengruppe mit einem solchen Grad von Anämie, jedoch mit normaler Nierenfunktion zu niedrig.^{12,15} Diese Studie bestätigte Erkenntnisse des relativen Erythropoietin-Mangels bei dialyseabhängigen Patienten.^{15,16} Außerdem wurden die Erythropoietin-Spiegel bei verschiedenen Patientengruppen bestimmt. Die folgende Tabelle zeigt die gemessenen Durchschnittswerte der EPO-Spiegel. Die Patientenkontrollen wurden nach dem Zufallsprinzip aus der betreffenden Patientengruppe ausgewählt.

Tabelle mit der Übersicht der mittleren EPO-Spiegel bei verschiedenen Patientengruppen gemessen mit dem EPO-Trac RIA-Kit

Diagnose	n	Mittelwert EPO (mU/mL)	SA
Normalbereich	36	15,7	10,5
Patientenkontrolle	18	18,6	11,3
Dialysepatienten	28	38,4	67,1
Myelodysplasie	2	651,0	887,2
Markfibrose	2	116,0	147,5
Erythroide Hypoplasie/Aplasie	4	1545	1213
Non-Hodgkins-Lymphome	15	26,4	13,8
Hodgkin-Krankheit	3	29,8	31,3
Chronische Lymphatische Leukämie	3	17,4	9,7
Makroglobulinämie	2	30,2	15,1
Myelom	3	49,7	52,3
Hämolytische Anämie	3	51,4	29,2
Sonstige Anämien	10	32,2	18,9
Erythrozytose-Patienten	6	14,6	8,5
Patienten mit primärer Polyzythämie	6	20,7	4,9

Die oben angegebenen Erythropoietin-Spiegel müssen nicht immer mit den angegebenen Krankheitsstadien übereinstimmen. Alle Patienten befanden sich in verschiedenen Stadien der Behandlung, durch welche sich die erwarteten EPO-Spiegel für das spezifische Stadium ihrer Erkrankung verändern könnten. Bei der Bewertung der spezifischen Erythropoietin-Spiegel müssen der Gesundheits- und Allgemeinzustand des jeweiligen Patienten und des EPO-Systems berücksichtigt werden.

14. LEISTUNGSDATEN

14.1 Reproduzierbarkeit

Inter-Assay-Variation Serum (Werte = mU/mL)

	Mittelwert	SA	(% VK)**	N
NIEDRIG	11,1	1,3	11,9	20
NIEDRIG	12,4	1,2	10,0	20
NIEDRIG	22,9	1,2	5,2	10
MITTEL	39,9	1,9	4,8	10
HOCH	106,5	5,1	4,8	10
HOCH	254,6	29,8	11,7	20

Intra-Assay-Variation Serum (Werte = mU/mL)

	Mittelwert	SA	(% VK)**	N
NIEDRIG	9,8	1,4	14,3	5
NIEDRIG	13,2	1,6	12,1	5
NIEDRIG	19,0	1,3*	6,7	5
MITTEL	40,9	1,4	3,5	5
HOCH	147,6	15,7	10,6	5
HOCH	220,2	26,9	12,2	5

* Die Proben wurden in 5 verschiedenen Tests analysiert (n = 5)

** % Vk = (SA ÷ Mittelwert) 100

14.2 RICHTIGKEIT: DIE RICHTIGKEIT DES ASSAYS WURDE MIT HILFE DES LINEARITÄTS- UND WIEDERFINDUNGSTESTS ÜBERPRÜFT.

Verdünnungsparallelismus

Serielle Verdünnungsstudie unbekannter Serumproben

Probe	Verdünnung	EPO MW (mU/mL)	% Mittelwert/ MW der Nullverdünnung
1	0	15,6*	–
	1:2	17,4	111,5
2	0	127,1	–
	1:2	124,8	98,2
	1:4	141,2	111,1
	1:8	152,0	119,6
3	0	96,6	–
	1:2	91,6	94,8
	1:4	100,4	103,9
	1:8	100,0	103,5
4	0	51,3	–
	1:2	52,8	102,9
	1:4	38,4	74,9
			MW = 102,3

* Nullverdünnungswerte sind die gemessenen Werte, die vor der Verdünnung mit der Serumverdünnung von DiaSorin gemessen wurden.

Genauigkeit

Wiederfindungsstudie

Serum (Werte = mU/mL)

Satz-Nr. 1	Hintergrund*	Hinzugefügter EPO-Kalibrator	Gemessener Wert**	Prozent Wiederfindung***
1	8,9	19,5	27,3	94,4
	8,9	41,5	51,9	103,6
	8,9	145,0	182,0	119,4
2	18,1	19,5	37,3	98,5
	18,1	41,5	66,0	115,4
	18,1	145,0	205,6	129,3
3	44,3	19,5	62,9	95,4
	44,3	41,5	87,6	104,3
	44,3	145,0	158,5	78,8
4	80,8	19,5	101,3	105,1
	80,8	41,5	127,1	111,6
	80,8	145,0	210,7	89,6
				MW = 103,8

* Getesteter Probenwert geteilt durch 2.

** Gleiches Volumen des EPO-Trac-Kalibrators 3, 4 und 5 sowie der Patientenprobe zusammen.

*** %Wiederfindung = [(gemessener Wert-Hintergrund)/hinzugefügter EPO] × 100

14.3 Analytische Sensitivität (Nachweisgrenzen)

Wenn die geringste nachweisbare Konzentration als die anscheinende Konzentration bei 2 Kalibratorabweichungen von den Zählungen bei maximaler oder keiner Bindung definiert wird, beträgt sie 4,4 mU/mL. Unbekannte Proben, die weniger als die Sensitivität dieses Tests anzeigen, müssen <4,4 mU/mL sein.

14.4 Analytische Spezifität

Ergebnisse eines Kreuzreaktivitätsexperiments mit dem EPO-Trac RIA-System und 8 natürlichen Serumproteinen ergaben eine Kreuzreaktivität von <0,001 %, wenn bei der Sensitivität des Tests gemessen wurde (4,4 mU/mL).

Substanzen	% Kreuzreaktivität
Humanes Serumalbumin	<0,001
Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	<0,001
Interleukin-3	<0,001
Alpha-1 Antitrypsin	<0,001
Humanes Choriongonadotropin	<0,001
Saures Alpha-1-Glykoprotein	<0,001
Humanes IgG	<0,001
Humanes IgM	<0,001

Die Gensequenz von Erythropoietin wurde mit allen humanen Gensequenzen aus der Genbank und den EMBL-Datenbanken verglichen. Bei der Suche wurden keine Gene festgestellt, die der Erythropoietin-Gensequenz signifikant ähnlich waren.

14.5 Störungen

Die Studien wurden entsprechend den CLSI-Methoden bewertet, um Störungen durch Hämoglobin, Triglyceride und Bilirubin zu bestimmen. Bei diesen Studien wurden keine Störungen beobachtet.

14.6 Probentyp

Die Plasma-EDTA- und Serumproben erwiesen sich zusammen als hoch korreliert.

Y (SERUM) = 0,9 + 0,993 (PLASMA); r = 0,93 (Bereich: 4,7-42,5 mU/mL; Serum).

LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE.

EQUIPO RIA ¹²⁵I EPO-TRAC

1. USO INDICADO

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*

El equipo RIA EPO-Trac™ tiene como finalidad la determinación cuantitativa de eritropoietina (EPO) en suero o plasma EDTA mediante ensayo radioinmunológico (RIA) para facilitar el diagnóstico de anemias y policitemias.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La eritropoietina (EPO) es una hormona glicoproteína (34.000 dalton) que estimula la maduración de los precursores de los glóbulos rojos. La EPO se produce en el riñón como respuesta a la cantidad de oxígeno en sangre. Por lo general, cuando cae el nivel de oxígeno, como hipoxia fisiológica, el nivel de EPO en el sistema circulatorio se incrementa y estimula el aumento de la producción de glóbulos rojos.¹

Los niveles anormales de EPO en sangre son característicos de algunos desórdenes patológicos específicos incluidas varias anemias, policitemia y tumores. La superproducción de EPO se ha asociado con el carcinoma renal. Algunos tumores hepáticos y tumores en otros órganos se han asociado con la producción ectópica de eritropoietina.²

La anemia se caracteriza por un nivel inadecuado de glóbulos rojos.² Los pacientes de anemia con altos niveles de EPO incluyen la anemia aplásica, anemia por deficiencia de hierro y anemia hemolítica. La anemia asociada con fallo renal crónico es el resultado de una producción insuficiente de EPO por parte del riñón.

La superproducción de glóbulos rojos se denomina policitemia. En la policitemia vera rubra sin tratar, la superproducción de glóbulos rojos por parte de los progenitores hematopoyéticos tiene lugar en presencia de concentraciones de EPO bajas o imposibles de detectar.³

La policitemia secundaria (estrés) está provocada por la producción y liberación de EPO que tiene como resultado un incremento de la masa de los glóbulos rojos. La policitemia secundaria puede estar provocada por varios factores como el tabaco, piedras en el riñón, fibrosis pulmonar, enfermedad cardíaca, tumores, o hemoglobina defectuosa.²

Se han desarrollado varios métodos para medir la eritropoietina en seres humanos y en animales. El desarrollo de los ensayos iniciales incluía un ensayo biológico en vivo en ratones vivos policitémicos no hipóxicos.^{4,5} Con el desarrollo de la eritropoietina recombinante humana, también se crearon ensayos *in vitro* más rápidos y económicos. Estos ensayos *in vitro* incluyen el ensayo radioinmunológico (RIA) y el ensayo inmunológico enzimático (EIA).

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El procedimiento del ensayo RIA ¹²⁵I EPO-Trac de DiaSorin consiste en un ensayo radioinmunológico en desequilibrio de unión competitiva que utiliza eritropoietina recombinante humana para el trazador y los calibradores. Las muestras se incuban con el anticuerpo de cabra primario EPO-Trac (cabra anti-EPO) y se permite que reaccionen durante 2 horas antes de añadir el trazador EPO-Trac marcado con yodo-125. Tras dejarlo incubar toda la noche, se añade el complejo de precipitación secundario de burro anti-cabra (DAG-PPT) a los tubos de ensayo específicos (TABLA I). El DAG-PPT es un suero burro anti-cabra precipitado con un suero de cabra normal y un tensioactivo. El DAG-PPT se incuba con calibradores o muestras, anticuerpo primario y trazador durante treinta minutos antes de centrifugar los tubos para separar el trazador unido del no unido. El trazador no unido se retira por decantación de los sobrenadantes de cada tubo de ensayo. El trazador unido y las pastillas de complejo DAG-PPT remanentes se cuentan en un contador gamma durante 1 minuto. Las cuentas de ¹²⁵I son inversamente proporcionales a la cantidad de EPO presente en cada muestra.

4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

Anticuerpo primario EPO-Trac (AZUL)	1 vial/11 mL
Calibradores EPO-Trac (0-5)	1 vial/11 mL, 5 viales/2,1 mL
PPT DAG EPO-Trac	2 viales/35 mLs
Trazador EPO-Trac (ROJO)	1 vial/11 mL
Controles EPO-Trac	2 viales/2,1 mL
Número de pruebas	100

ALMACENAMIENTO: Tras su recepción, el equipo debe almacenarse a 2-8° C. Una vez abiertos, almacene los reactivos a 2-8° C hasta la fecha de vencimiento que figura en la etiqueta. Los reactivos no deben utilizarse después de la fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento del equipo se indica en la etiqueta externa y se corresponde con la fecha de vencimiento del trazador.

No deben mezclarse reactivos de diferentes lotes.

4.1 Calibradores EPO-Trac, 0-5: reactivo listo para utilizar

Seis calibradores de eritropoietina recombinante con concentraciones nominales entre aproximadamente 0 y 280 mU/mL, prediluidos en solución salina tamponada con estabilizadores de proteína, antimicrobianos y azida sódica al 0,1%. Estos calibradores se ajustan con referencia al 2° estándar de la Organización Mundial de la Salud (OMS), HUM, bioensayo / urinario 67/343⁶ y al estándar internacional de la OMS de calibrador para eritropoietina, código derivado de DNA recombinante (rDNA) #87/684. Los calibradores del equipo han demostrado tener conmutabilidad con muestras de pacientes cuando se utilizan con los reactivos y el procedimiento recomendados para esta prueba de diagnóstico in vitro.

4.2 ¹²⁵I EPO-Trac: reactivo listo para utilizar

La eritropoietina recombinante humana se etiqueta con yodo-125, 2 µCi (74 kBq), y se diluye en una solución salina tamponada con estabilizadores de proteína, antimicrobianos, azida sódica al 0,1% y la tintura roja n° 40 de la Food, Drug and Cosmetic (FD & C).

4.3 Anticuerpo primario EPO-Trac: reactivo listo para utilizar

Suero EPO de cabra anti-humano diluido con solución salina tamponada con estabilizadores de proteína, antimicrobianos, azida sódica al 0,1% y tintura azul n° 1 de la FD & C.

4.4 Complejo de precipitación EPO-Trac, DAG-PPT: reactivo liofilizado

Suero de burro anti-cabra precipitado con suero de cabra normal y tensioactivo, diluido en tampón borato BSA con antimicrobianos y timerosal al 0,03% y liofilizado. Reconstituya el vial con 35 mL de agua purificada; mezcle bien hasta que la suspensión aparezca homogénea y, a continuación, déjelo reposar durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente mezclando de vez en cuando. Agite con movimientos envolventes o mezcle con un pequeño agitador magnético a velocidad muy baja mientras introduce DAG-PPT en los tubos. Si el reactivo parece estar rehidratado antes de su uso, no lo utilice.

4.5 Controles EPO-Trac, niveles 1 y 2: reactivo listo para utilizar

Se añade EPO recombinante humano a una solución salina tamponada con estabilizador de proteína para lograr una concentración que se encuentre dentro de un rango específico indicado en el certificado de análisis. Se añaden azida sódica al 0,1% y otros estabilizadores.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*

No debe destinarse al uso interno o externo en seres humanos ni animales.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE AZIDA SÓDICA

PRECAUCIÓN: Algunos reactivos de este equipo contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas. Al desecharlo, enjuague con abundante agua para evitar que se acumule la azida. Para obtener información adicional, consulte "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," en el manual Guide-Safety Management N° CDC-22 publicado por Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EE.UU.,1976.

Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 1999/45/EC)

R 20/21/22 - Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

R 32 - En contacto con ácidos libera gases altamente tóxicos.

S28 - En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con abundante agua.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE TIMEROSAL

Algunos reactivos de este equipo contienen timerosal que es un compuesto de mercurio. La eliminación del mercurio elemental, el mercurio inorgánico, los óxidos de mercurio y los compuestos de mercurio debe realizarse en conformidad rigurosa con todas las normativas locales, nacionales y comunitarias.

ADVERTENCIA: Este producto contiene un producto químico conocido en el Estado de California por causar defectos de nacimiento y otros daños reproductivos.

REACTIVOS CON CONTENIDO DE YODO-125

Este equipo contiene material radiactivo que no supera de 2 μCi (74 kBq) de yodo-125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas *in vitro* clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución decontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorios.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, el uso, la transferencia y la eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

ADVERTENCIA: Este producto contiene una sustancia química conocida por el Estado de California como causante de cáncer.

ATENCIÓN: La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

ADVERTENCIAS ADICIONALES

1. Evite las salpicaduras o la generación de aerosoles.
2. Los tiempos y las temperaturas de incubación distintas de las especificadas pueden provocar resultados erróneos.
3. La contaminación microbiana de los reactivos puede provocar resultados incorrectos.
4. No cambie los reactivos por otros de lotes distintos o de otros fabricantes.

6. REQUISITOS DE LA MUESTRA

PRECAUCIÓN: Las muestras del paciente y todos los materiales que se ponen en contacto con ellas deben ser tratados como posibles agentes infecciosos y deben desecharse con las precauciones apropiadas.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE SUERO Y PLASMA

Una muestra de sangre apropiada debe recogerse de forma aséptica por punción venosa en un tubo de vidrio estéril de 5 ó 10 mL para que produzca un mínimo de 400 µL de suero o plasma EDTA por ensayo (para 2 réplicas). Debe tenerse cuidado para retirar el suero del coágulo con rapidez, por centrifugación para evitar la hemólisis. Centrifugue el suero o el plasma a temperatura ambiente durante 10 minutos a 760 x g*. Debe utilizarse EDTA (72 mg/5 mL de sangre) como anticoagulante para el plasma. No se precisan otros aditivos ni conservantes para mantener la integridad de la muestra.

El suero o el plasma EDTA debe colocarse en tubos de almacenamiento cubiertos estériles. El suero es estable hasta 7 días a 4° C. Si desea almacenarlo más tiempo, congélelo a -20° C en un congelador con auto descongelación. DiaSorin ha comprobado que las muestras de suero permanecen estables hasta 18 meses cuando están permanente congeladas a -20° C. Las muestras de suero no deben congelarse y descongelarse de forma reiterada. Todos los materiales de plástico, vidrio u otros que entren en contacto con la muestra deben estar completamente limpios de contaminación.

Es recomendable, pero no imprescindible, tomar la muestra en ayunas, para evitar interferencias imprevistas de sustancias liposolubles. Deben rechazarse las muestras con evidencias de hemólisis. No se ha detectado que la bilirrubina (<5 mg/dL) interfiera con este ensayo. No se ha examinado la posible interferencia de medicamentos.

7. EQUIPO Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- 7.1 Guantes de goma /látex para utilizar mientras se realiza la prueba.
- 7.2 Tubos desechables de vidrio de borosilicato, 12 x 75 mm.
- 7.3 Centrifuga controlada por temperatura (20-25° C) con capacidad para 12 tubos de 75 mm a 1600 ±20 g*.
- 7.4 Contador de centelleo de rayos gamma calibrado y capaz de contar yodo-125.
- 7.5 Mezclador vórtex.
- 7.6 Utensilios de dosificación.
 - a. Micropipetas calibradas para suministrar 200 (±4) µL.
 - b. Dispensadores repetitivos calibrados para suministrar 100 (±2) µL y 500 (±5) µL.
- 7.7 Agua purificada para diluir el DAG-PPT.
- 7.8 Temporizador para medir con precisión ±2 minutos.
- 7.9 Tres papeles gráficos semilog.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

8. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

- 8.1 Prepare muestras desconocidas.
- 8.2 Prepare y etiquete por duplicado 12 tubos desechables de vidrio de 75 mm según el programa de ensayo de la contraportada.
- 8.3 Añada los reactivos de este modo:
 - a. **Tubos de cuentas totales**
Reserve hasta el paso 6 (utilizado para los cálculos del control de calidad; vea la sección Control de calidad).
 - b. **Tubos de unión no específica (NSB)**
200 µL de calibrador 0 por tubo
 - c. **Calibrador 0**
200 µL de calibrador 0 por tubo
 - d. **Calibradores EPO-Trac (1-5)**
200 µL de calibrador por tubo
 - e. **Controles y muestras desconocidas**
200 µL de cada muestra o control por tubo
- 8.4 Añada 100 µL de anticuerpo primario de cabra EPO (azul) a cada tubo salvo a los tubos de cuentas totales y los NSB.
- 8.5 Agite los tubos con suavidad en vórtex e incube durante 2 horas (± 10 minutos) a temperatura ambiente (20-25° C).
- 8.6 Añada 100 µL de trazador EPO (rojo) a todos los tubos.
- 8.7 Agite los tubos con suavidad en vórtex e incube durante 16-24 horas a 2-8° C.
- 8.8 Mezcle con vigor el DAG-PPT antes de suministrarlo. Agite con movimientos envolventes o mezcle el DAG-PPT con un pequeño agitador magnético a velocidad muy baja mientras suministra 500 µL a todos los tubos excepto a los de cuentas totales.
- 8.9 Agite en vórtex; a continuación, incube los tubos durante 30 (± 5) minutos a temperatura ambiente (20-25° C).
- 8.10 Centrifugue los tubos durante 20 minutos a 1600 x g* y 20-25° C.
- 8.11 Reserve los tubos de cuentas totales; decante el sobrenadante de los restantes tubos en un contenedor apropiado para desechos radiactivos. Seque los tubos en posición invertida sobre papel absorbente para eliminar todas las gotas de sobrenadante que pueden permanecer en los bordes antes de ponerlos hacia arriba.
- 8.12 Cuento el precipitado de cada tubo y los tubos de cuentas totales durante un minuto en un contador de centelleo de rayos gamma.

9. COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

- 9.1 Añada cada alícuota de reactivo al tercio inferior de los tubos de ensayo para asegurar la mezcla completa de los reactivos.
- 9.2 Si no es posible decantar los tubos en los primeros 5 minutos tras el final de la centrifugación, vuelva a centrifugarlos antes de decantar el sobrenadante.
- 9.3 Para asegurar completamente el resultado sólido del ensayo RIA, deben comprobarse varios factores adicionales. DiaSorin recomienda comprobar periódicamente los siguientes parámetros para asegurar el desempeño uniforme del equipo.
 - a. **Cuentas totales**
 - b. **Unión máxima**
Promedio de cuentas por minuto (CPM) de los tubos de calibrador 0 /
Promedio de CPM de los tubos de cuentas totales

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

c. Unión no específica

Promedio de CMP de los tubos NSB / Promedio de CPM de los tubos de cuentas totales

d. Pendiente de la curva del calibrador

Por ejemplo, controle los puntos de supresión del 80, 50 y 20% de la línea del calibrador.

10. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe incluir al menos dos controles en cada ensayo para supervisar sus resultados. Pueden utilizarse controles disponibles en el mercado o los dos controles de referencia que se suministran con el equipo. Los controles del equipo contienen EPO en dos concentraciones. DiaSorin ha evaluado los controles del equipo con el equipo RIA ^{125I} EPO-Trac de DiaSorin. El rango de concentraciones de cada control aparece en el certificado de análisis, e indica los límites definidos por DiaSorin para los valores de control que se pueden obtener a partir de ensayos fiables. Deben mantenerse gráficos de control de calidad para llevar un seguimiento del desempeño del control. Cada laboratorio debe establecer límites de desempeño aceptables para cada nivel de control mediante métodos estadísticos diseñados para detectar errores sistemáticos y aleatorios. Los resultados de control deben cumplir los criterios de aceptabilidad del laboratorio antes de informar los resultados de las pruebas con pacientes.^{19, 20, 21}

11. CÁLCULO DE RESULTADOS

Hay numerosos métodos para calcular los resultados de los ensayos RIA. Todos tienen como finalidad obtener una curva de calibrado que relacione el alcance de la unión con diferentes concentraciones de los calibradores de calibrado. El gráfico puede tener una escala lineal o logarítmica. Cada uno de estos métodos indica básicamente los mismos valores para controles y muestras, aunque algunos ensayos pueden "ajustarse" mejor a un método determinado que a otro. El método de cálculo del Laboratorio de Control de Calidad de DiaSorin es B/B_0 % [cantidad de unión de trazador por muestra (B), dividido por la cantidad de unión de trazador por calibrador cero (B_0) x 100] (vea el paso 3) frente a concentración logarítmica.

11.1 Calcule el promedio de CMP de cada calibrador, control y muestra desconocida.

11.2 Reste el promedio de CPM de los tubos de uniones no específicas (NSB) de todas las cuentas.

11.3 Divida las CPM corregidas de cada calibrador, control o muestra por las CPM corregidas del calibrador 0.

$$\% B/B_0 = \frac{\text{CPM de calibrador o muestra desconocida} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM de calibrador 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

11.4 Con un papel gráfico semilog de tres ciclos, trace el B/B_0 porcentual para los calibradores EPO-Trac (eje vertical) frente a la concentración impresa en la hoja de especificaciones del control de calidad (eje horizontal).

11.5 Una los puntos con una línea de ajuste óptimo (FIGURA 1).

11.6 Interpole los niveles de eritropoietina en las muestras desconocidas del trazado.

11.7 Si la lectura de alguna de las muestras desconocidas es $<4,4$ mU/mL, el límite de detección de esta prueba, registre el valor como $<4,4$ mU/mL.

11.8 Si la lectura de cualquiera de las muestras desconocidas es mayor que el calibrador más alto, se la debe diluir con calibrador 0 EPO-Trac, n° de catálogo 23211 y volver a someter a ensayo. Las diluciones de 1:2 y 1:5 serán suficientes para la mayoría de las muestras.

12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 12.1** Los resultados de este ensayo deben utilizarse junto con otra información disponible procedente de evaluaciones clínicas y otros procedimientos de diagnóstico.
- 12.2** No se comprobado la indiferencia en el ensayo de ningún medicamento.

TABLA II
Datos de muestras de ensayos RIA EPO-Trac™ DE DIASORIN

Tubo	CPM (mU/mL)	Promedio CPM	Promedio (CPM-NSB) (B)	Porcentaje unión (B/T)**	Porcentaje unión (B/B ₀)	Conc. (mU/mL)	*Corr. Conc.
Cuentas totales	14.823						
(T)14,270	14.546						
NSB	492						
	447	470		3,2**			
Calibrador 0	4.783						
	4.904	4.844	4.374 (B ₀)	33**	100,0	0	
Calibradores							
1	4.321						
	4.273	4.297	3.827		87,5	9,0	
2	3.832						
	3.773	3.803	3.333		76,2	19,0	
3	2.896						
	2.920	2.908	2.438		55,7	39,0	
4	1.645						
	1.669	1.657	1.187		27,1	83,0	
5	865						
	932	898	428		9,8	290,0	
Control nivel 1	3.924						
	3.877	3.901	3.431		74,4	16,9	
Control nivel 2	1.918						
	1.935	1.927	1.457		33,3	69,3	
Desc. nº 1	1.217						
	1.232	1.225	755		17,3	127	
1:2	1.832						
	1.873	1.853	1.383		31,6	72,6	124,8
Desc. nº 2	1.508						
	1.437	1.472	1.002		22,9	96,6	
1:2	2.264						
	2.309	2.286	1.816		41,5	56,0	91,6

La TABLA II y la FIGURA 1 muestran ejemplos de datos típicos de muestras y de una curva de calibrado; esta información sólo debe utilizarse como referencia y no para calcular ningún valor.

* Corr. conc. = Concentración corregida; solo para muestras diluidas.

** Estos parámetros se supervisan para el control de calidad (vea la sección Control de calidad).

CURVA DE CALIBRADOR DE MUESTRA DE EPO

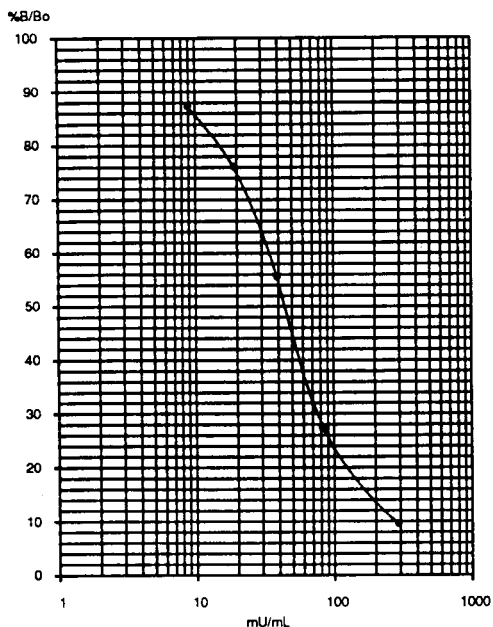


FIGURA 1

* Este gráfico se genera a partir de los datos de muestras (TABLA II) y se utiliza solo como referencia. No lo utilice para calcular los valores del ensayo.

13. VALORES PREVISTOS

13.1 Rango normal

Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal.

Los niveles de eritropoietina se midieron en ciento cuatro (104) hombres y mujeres normales (45 H, 61 M) de Minneapolis, Minnesota mediante el ensayo RIA EPO-Trac. Se determinó un valor medio de EPO de $17,7 \pm 7,5$ mU/mL. Los valores individuales se encontraron entre un mínimo de 4,9 y un máximo de 52,7 mU/mL. El valor medio de EPO en suero para mujeres normales fue de 18,3 y de 16,6 mU/mL en hombres normales. No se observó ninguna diferencia estadística ($p = 0,27$) entre los niveles de EPO en hombres y mujeres.

Otras investigaciones de individuos normales, utilizando ensayos RIA de EPO internos determinaron niveles medios de EPO similares a los del estudio anterior.^{2, 4, 5} Algunos de estos estudios encontraron diferencias significativas pero pequeñas entre hombres y mujeres: las mujeres tenían valores ligeramente superiores a los de los hombres.^{8, 9} Los resultados de estos estudios se resumen en la tabla siguiente:

Estudio	Sexo	n=	Media \pm 1 S.D.
Koeffler 1981 ²	ambos	26	$14,9 \pm 4,2$ mU/mL
Garcia 1982 ⁴	hombres	364	$17,2 \pm 5,5$ mU/mL
	mujeres	199	$18,8 \pm 6,2$ mU/mL
Ryner 1989 ⁵	hombres	50	$8,0 \pm 3,2$ mU/mL
	mujeres	50	$11,3 \pm 3,4$ mU/mL

13.2 Valores de estado de enfermedad

Las concentraciones anormales de EPO en circulación, observadas junto con información clínica adicional, pueden ser características de estados de enfermedad específicos.

Los pacientes con policitemia rubra vera presentan generalmente un nivel EPO en suero normal o inferior cuando se mide con ensayos RIA internos.^{8,9} Estos pacientes con policitemia secundaria provocada por hipoxia, como en el fallo cardíaco congestivo o en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, presentan niveles elevados de EPO.^{3,8,9} La producción ectópica de EPO puede provocar en ocasiones un elevado nivel de EPO en suero y la subsiguiente policitemia secundaria en pacientes con mioma urinario, hemangioblastoma cerebeloso, carcinoma hepático y feocromocitoma. Los tumores renales, incluidos hipernefoma, adenoma y sarcoma, pueden provocar una eritrocitosis similar relacionada con EPO.²

La mayoría de los pacientes anémicos tienen un elevado nivel de EPO en suero aunque el alcance del nivel depende del grado y el tipo de la anemia. Pueden encontrarse incrementos de EPO en suero en pacientes con anemia de célula falciforme o infección HIV aunque los niveles EPO, en general, son menos pronunciados que en otras anemias.^{10,11}

Se cree que las anemias encontradas en pacientes con enfermedades renales son el resultado de una deficiente producción de eritropoietina debido a riñones enfermos o a su ausencia. Los pacientes de diálisis anémicos anéfricos tienen niveles de EPO bajos o imposibles de detectar.¹² Por otro lado, los pacientes dependientes de diálisis, con enfermedad renal terminal, tienen generalmente un nivel normal o elevado de EPO en suero. En cualquier caso, se cree que los niveles de EPO en suero detectados en estos pacientes son demasiado bajos para su grado de anemia.^{12,13} Los pacientes con trasplantes de riñón reciente tienen, en ocasiones, un elevado nivel de EPO en suero como respuesta a su anemia.¹⁴

En un estudio clínico realizado en Minneapolis, Minnesota, los niveles de EPO se midieron con el ensayo RIA EPO-Trac en veintiocho (28) pacientes néfricos de diálisis con enfermedad renal terminal. El promedio de los niveles de EPO en suero fue de $38,4 \pm 67,1$ mU/mL (rango: 10,4-360,6 mU/mL), mientras el promedio de los niveles de hemoglobina fue de $9,4 \pm 1,6$ g/dL (rango: 6,9 to 12,3 g/dL). Se consideró que este valor era demasiado bajo para una población de pacientes con un grado de anemia equivalente, pero función renal normal.^{12,15} Este estudio confirmó los descubrimientos de investigadores anteriores relativos a la deficiencia de eritropoietina en pacientes dependientes de diálisis.^{15,16} Asimismo, se determinaron los niveles de eritropoietina en una serie de grupos de pacientes. La tabla siguiente muestra el promedio de los niveles de EPO medidos. Los controles de pacientes se seleccionaron de forma aleatoria de la población de pacientes evaluada.

Tabla resumen de niveles medios de EPO en varios grupos de pacientes mediante el equipo RIA EPO-Trac

Diagnóstico	n	Media EPO (mU/mL)	S.D.
Normales	36	15,7	10,5
Controles de pacientes	18	18,6	11,3
Pacientes en diálisis	28	38,4	67,1
Mielodisplasia	2	651,0	887,2
Mielofibrosis	2	116,0	147,5
Hipoplasia eritroide / Aplasia	4	1545	1213
Linfoma no Hodgkin	15	26,4	13,8
Enfermedad de Hodgkin	3	29,8	31,3
Leucemia linfocítica crónica	3	17,4	9,7
Macroglobulinemia	2	30,2	15,1
Mieloma	3	49,7	52,3
Anemia hemolítica	3	51,4	29,2
Anemias varias	10	32,2	18,9
Pacientes con eritrocitosis	6	14,6	8,5
Pacientes con policitemia vera	6	20,7	4,9

Los niveles de eritropoietina indicados arriba pueden ser coherentes o no con los estados de enfermedad de la lista. Todos los pacientes estaban en diferentes estados de tratamiento lo que puede alterar el nivel de eritropoietina esperado para su estado de enfermedad específico. Debe tenerse en consideración el estado individual del paciente y la salud de su sistema de eritropoietina al interpretar los niveles específicos de ésta.

14. DATOS DE RENDIMIENTO

14.1 Capacidad de reproducción

Variación dentro del ensayo Suero (valores = mU/mL)

	Valor de la media	S.D.	(% C.V.)**	N
BAJO	11,1	1,3	11,9	20
BAJO	12,4	1,2	10,0	20
BAJO	22,9	1,2	5,2	10
MEDIO	39,9	1,9	4,8	10
ALTO	106,5	5,1	4,8	10
ALTO	254,6	29,8	11,7	20

Variación entre ensayos Suero (valores = mU/mL)

	Valor de la media	S.D.	(% C.V.)**	N
BAJA	9,8	1,4	14,3	5
BAJA	13,2	1,6	12,1	5
BAJA	19,0	1,3*	6,7	5
MEDIO	40,9	1,4	3,5	5
ALTO	147,6	15,7	10,6	5
ALTO	220,2	26,9	12,2	5

* Las muestras se sometieron a cinco ensayos independientes (n = 5)

** % C.V. = (S.D. ÷ media) 100

14.2 VERACIDAD: LA VERACIDAD DEL ENSAYO SE COMPROBÓ CON LA PRUEBA DE LINEALIDAD Y DE RECUPERACIÓN.

Paralelismo de dilución

Estudio de dilución en serie de muestras desconocidas de suero

Número	Dilución	EPO Media (mU/mL)	% media/ 0 Media de dilución
1	0	15,6*	—
	1:2	17,4	111,5
2	0	127,1	—
	1:2	124,8	98,2
	1:4	141,2	111,1
	1:8	152,0	119,6
3	0	96,6	—
	1:2	91,6	94,8
	1:4	100,4	103,9
	1:8	100,0	103,5
4	0	51,3	—
	1:2	52,8	102,9
	1:4	38,4	74,9
			Media = 102,3

* Los valores de dilución cero eran los valores medidos antes de la dilución con disolvente de suero de DiaSorin.

Exactitud

Estudio de recuperación Suero (valores = mU/mL)

Nº de juego	Valor de fondo*	Calibrador EPO añadido	Valor medido**	Porcentaje de recuperación***
1	8,9	19,5	27,3	94,4
	8,9	41,5	51,9	103,6
	8,9	145,0	182,0	119,4
2	18,1	19,5	37,3	98,5
	18,1	41,5	66,0	115,4
	18,1	145,0	205,6	129,3
3	44,3	19,5	62,9	95,4
	44,3	41,5	87,6	104,3
	44,3	145,0	158,5	78,8
4	80,8	19,5	101,3	105,1
	80,8	41,5	127,1	111,6
	80,8	145,0	210,7	89,6
				Media = 103,8

* Valor de muestra sometida a ensayo dividido por 2.

** Volumen igual de calibrador EPO-Trac 3, 4 y 5, y muestra de paciente combinada.

*** % recuperación = [(medido-valor de fondo)/EPO añadida] x 100

14.3 Sensibilidad analítica (límites de detección)

La concentración mínima detectable de EPO es de 4,4 mU/mL, cuando se define como la concentración aparente en 3 desviaciones de calibrador a partir de las cuentas en el máximo o unión cero. Las muestras desconocidas cuyas lecturas sean inferiores a la sensibilidad de este ensayo deben registrarse como <4,4 mU/mL.

14.4 Especificidad analítica

Los resultados de un experimento de reactividad cruzada con el sistema RIA EPO-Trac y 8 proteínas de suero de presencia natural mostró una reactividad cruzada de <0,001% medida a la sensibilidad del ensayo (4,4 mU/mL).

Sustancias	% reactividad cruzada
Albúmina humana	<0,001
Factor de estimulación de colonia granulocítico macrófago (GM-CSF)	<0,001
Interleukin-3	<0,001
Alpha-1 Antitrypsin	<0,001
Gonadotropina coriónica humana	<0,001
Alfa-1 glicoproteína ácida	<0,001
IgG humano	<0,001
IgM humano	<0,001

La secuencia genética de la eritropoietina se comparó con todas las secuencias de los genes humanos del GenBank y las bases de datos EMBL. La búsqueda no encontró genes con una similitud significativa a la secuencia del gen de la eritropoietina.

14.5 Interferencia

Los estudios se evaluaron de acuerdo con métodos del CLSI para determinar la interferencia de la hemoglobina, los triglicéridos y la bilirrubina. Dichos estudios indican que no se observaron interferencias.

14.6 Tipo de muestra

Se encontró una elevada correlación de las muestras emparejadas de plasma EDTA y suero.

$Y (\text{SUERO}) = 0,9 + 0,993 (\text{PLASMA}); r = 0,93$ (rango: 4,7 - 42,5 mU/mL; suero).

CONSULTE LA BIBLIOGRAFÍA EN LA ÚLTIMA PÁGINA.

KIT ¹²⁵I RIA EPO-TRAC

1. USO PREVISTO

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

Il kit EPO-Trac™ RIA serve per la determinazione quantitativa di eritropoietina (EPO) nel siero o plasma EDTA mediante analisi radioimmunologica (RIA) per la diagnosi di anemie e policitemia.

2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

L'eritropoietina (EPO) è una glicoproteina (34.000 dalton) che stimola la maturazione dei precursori degli eritrociti. L'EPO è secreto dal rene in risposta al contenuto di ossigeno nel sangue. Normalmente, quando i livelli di ossigeno si abbassano, come nel caso di ipossia fisiologica, il livello di EPO in circolo aumenta e stimola una maggiore produzione di eritrociti.¹

Livelli anomali di EPO in circolo sono caratteristici di disturbi patologici specifici, fra cui varie forme di anemia, policitemia e tumori. La sovrapproduzione di EPO è stata associata al carcinoma renale. Alcune forme di tumore del fegato e di tumore di altri organi sono stati associati alla produzione ectopica di eritropoietina.²

L'anemia è caratterizzata da livelli insufficienti di eritrociti.² I pazienti anemici con livelli elevati di EPO presentano anemia aplastica, anemia da carenza di ferro e anemia emolitica. L'anemia associata a disfunzioni renali croniche è il risultato di una scarsa produzione di EPO da parte del rene.

La sovrapproduzione di eritrociti è definita policitemia. Nella policitemia rubra vera non curata, la sovrapproduzione di eritrociti da parte dei progenitori ematopoietici avviene in presenza di concentrazioni di EPO basse o non individuabili.³

La policitemia secondaria (da stress) è causata da una aumentata produzione e rilascio di EPO dovuta ad una maggiore massa di eritrociti. La policitemia secondaria può essere causata da vari fattori, quali fumo, calcoli renali, fibrosi polmonare, malattie cardiache, tumori o emoglobina anormale.²

Sono stati studiati diversi metodi per la misurazione dell'eritropoietina negli uomini e negli animali. Le prime analisi prevedevano un bioassay in vivo che utilizzava topi vivi con policitemia exipossica.^{4,5} Con lo sviluppo di eritropoietina umana ricombinante, sono state sviluppate analisi in vitro che avevano il vantaggio di richiedere tempi e costi minori. Queste analisi in vitro comprendono l'analisi radioimmunologica (RIA) e il dosaggio immunoenzimatico (EIA).

3. PRINCIPIO DELL'ANALISI

La procedura ¹²⁵I RIA EPO-Trac di Diasorin è una analisi radioimmunologica di disequilibrio, con legame in competizione che utilizza eritropoietina umana ricombinante sia per il tracciante che per i calibratori. I campioni vengono incubati con l'anticorpo primario di capra EPO-Trac (capra anti-EPO) e lasciati reagire per 2 ore prima di aggiungere il tracciante EPO-Trac etichettato con iodio-125. Dopo una notte di incubazione, nelle provette di analisi viene aggiunto l'anticorpo secondario complesso precipitante asino anti-capra (DAG-PPT) (TABELLA I). Il DAG-PPT è un siero asino anti-capra che è pre-precipitato con un normale siero di capra e un surfactante. Il DAG-PPT viene incubato con calibratori o campioni, anticorpo primario e tracciante, per trenta minuti prima di centrifugare le provette per separare il tracciante legato dal tracciante non legato. Il tracciante non legato viene rimosso mediante decantazione del liquido superficiale da ogni provetta. Il tracciante legato nei precipitati DAG-PPT residui viene contato per 1 minuto con un contatore a raggi gamma. I conteggi di ¹²⁵I sono inversamente proporzionali alla quantità di EPO presente in ogni campione.

4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

Anticorpo primario EPO-Trac (BLU)	1 fiala/11 mL
Calibratori EPO-Trac (0-5)	1 fiala/11 mL, 5 fiale/2.1 mL
EPO-Trac DAG-ppt	2 fiale/35 mL
Tracciante EPO-Trac (ROSSO)	1 fiala/11 mL
Controlli EPO-Trac	2 fiale/2,1 mL
Numero di test	100

CONSERVAZIONE: Il kit deve essere conservato a 2-8°C. Dopo l'apertura, conservare ogni reagente a 2-8° fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. I reagenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e si riferisce alla data di scadenza del tracciante.

Non si devono mescolare reagente di lotti diversi.

4.1 Calibratori EPO-Trac, 0-5: reagente pronto all'uso

Sei calibratori per eritropoietina ricombinanti, a concentrazioni normali varianti fra circa 0 e 280 mU/mL, prediluiti in una soluzione salina tamponata con stabilizzatori delle proteine, antimicrobici e 0.1% sodio azide. I calibratori sono conformi con World Health Organization (WHO) 2nd IRP Erythropoietin, HUM, Urinary/Bioassay 67/343⁶ e WHO (IS) International Calibrator for Erythropoietin, Recombinant DNA (rDNA) - codice di derivazione #87/684. I calibratori del kit dimostrano commutabilità con i campioni del paziente quando usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico in vitro, come consigliato.

4.2 ¹²⁵I EPO-Trac: reagente pronto all'uso

L'eritropoietina umana ricombinante è etichettata con iodio-125, 2 µCi (74 kBq), e diluita in una soluzione salina tamponata con stabilizzatori delle proteine, antimicrobici, 0.1% sodio azide e colorante rosso N. 40 secondo il Food, Drug and Cosmetic (FD & C).

4.3 Anticorpo primario EPO-Trac: reagente pronto all'uso

Il siero EPO capra anti-umano è diluito con una soluzione salina tamponata con stabilizzanti delle proteine, antimicrobici, 0.1% sodio azide e colorate blu N. 1 secondo il FD & C.

4.4 Complesso precipitante EPO-Trac, DAG-PPT: reagente liofilizzato

Il siero asino anti-capra è pre-precipitato con normale siero di capra e surfactante, diluito in un tampone BSA-borato con antimicrobici e 0.03% timerosal e liofilizzato. Ricostituire la fiala con 35 mL di acqua depurata; mescolare accuratamente fino a quando la sospensione si presenta omogenea, quindi lasciar riposare per almeno 30 minuti a temperatura ambiente mescolando occasionalmente. Agitare energicamente o mescolare con un piccolo agitatore magnetico a velocità molto bassa mentre si distribuisce DAG-PPT nelle provette. Non usare il reagente se questo mostra segni di reidratazione prima dell'uso.

4.5 Controlli EPO-Trac, Livelli 1 e 2: reagente pronto all'uso

Ad una soluzione salina tamponata con stabilizzatore delle proteine si aggiunge EPO umano ricombinante al fine di ottenere una concentrazione entro il range specificato indicato sul certificato di analisi. Vengono aggiunti 0.1% sodio azide ed altri stabilizzanti.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

Non per uso interno o esterno su animali o persone.

REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE

ATTENZIONE: Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con componenti in piombo o rame e formare quindi azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con abbondante acqua al fine di evitare la formazione di azide. Per ulteriori informazioni, consultare "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," nel manuale Guide-Safety Management No. CDC-22 pubblicato dai Centri per il controllo e la Prevenzione delle malattie di Atlanta, GA, USA, 1976.

Frasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)

R 20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Dannoso per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).

R 32 - Contact with acids liberates very toxic gas (Il contatto con acidi libera gas altamente tossico).

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water (Dopo il contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua).

REAGENTI CONTENENTI TIMEROSAL

Alcuni reagenti di questo kit contengono timerosal in cui è presente un composto di mercurio. Lo smaltimento di mercurio elementare, mercurio inorganico, ossidi di mercurio e composti di mercurio deve essere effettuato in stretta conformità con le norme locali e statali.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare difetti congeniti o altre lesioni ai feti.

REAGENTI CONTENENTI IODIO-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 2 μ Ci (74kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test *in vitro* clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

AVVERTENZA: Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare cancro.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

AVVERTENZE SUPPLEMENTARI

1. Evitare di spruzzare o usare come aerosol.
2. Tempi di incubazione o temperature diverse da quelli specificati possono dare risultati erranei.
3. La contaminazione microbica dei reagenti può dare risultati errati.
4. Non sostituire reagenti con quelli di altri lotti o di altri costruttori.

6. REQUISITI PER I CAMPIONI

AVVERTENZA: I campioni dei pazienti e tutti i materiali che vengono in contatto con i campioni devono essere maneggiati come se in grado di trasmettere infezioni e devono essere smaltiti con le adeguate precauzioni.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEL SIERO O DEL PLASMA

Prelevare una quantità sufficiente di sangue in maniera asettica mediante venopuntura in una provetta sterile da 5 o 10 mL sotto vuoto in modo da ottenere un minimo di 400 µL di siero o plasma EDTA per analisi (per 2 replicati). Rimuovere prontamente il siero dal coagulo mediante centrifugazione per evitare l'emolisi. Centrifugare il siero o il plasma a temperatura ambiente per 10 minuti a 760 x g*. Usare EDTA (72 mg/5 mL di sangue) come anticoagulante per il plasma. Non sono richiesti altri additivi o conservanti per mantenere l'integrità del campione.

Il siero o il plasma EDTA devono essere conservati in provette sterili chiuse. Il siero rimane stabile fino a 7 giorni alla temperatura di 4°C. Per tempi di conservazione più lunghi, congelarlo a -20°C in un congelatore autosbrinante. DiaSorin ha verificato che i campioni di siero rimangono stabili fino a 18 mesi se congelati ininterrottamente a -20°C. I campioni di siero non devono essere congelati e scongelati ripetutamente. Tutto il materiale in plastica, oggetti in vetro o altro materiale che viene a contatto con i campioni deve essere completamente esente da qualsiasi contaminazione.

Si consigliano campioni prelevati a digiuno, anche se non obbligatorio, al fine di evitare interferenze impreviste da sostanze liposolubili. Scartare campioni visibilmente emolizzati. La bilirubina (<5 mg/dL) non ha dimostrato interferire con questa analisi. Non sono state studiate le interferenze di farmaci.

7. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI, NON FORNITI IN DOTAZIONE

- 7.1 Guanti in gomma/lattice da indossare durante l'analisi.
- 7.2 Provette in vetro borosilicato monouso, 12 x 75 mm.
- 7.3 Centrifuga a temperatura controllata (20-25°C) adatta per 12 provette da 75 mm centrifugate a 1600 ±20 g*.
- 7.4 Contatore ad emissione di scintille gamma calibrato e adatto per il conteggio di iodio-125.
- 7.5 Mixer Vortex.
- 7.6 Dispositivi per operazioni con pipetta:
 - a. Micropipette calibrate per inviare 200 (±4) µL.
 - b. Dosatori a ripetizione calibrati per inviare 100 (±2) µL e 500 (±5) µL.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$$

- 7.7 Acqua depurata per diluire DAG-PPT.
- 7.8 Timer per contare con precisione fino a ± 2 minuti.
- 7.9 Carta millimetrata per modello semi-logaritmico a tre cicli.

8. PROCEDURA DI ANALISI

- 8.1 Preparare i campioni non noti.
- 8.2 Preparare ed etichettare due serie di 12 provette monouso da 75 mm in base allo Schema di analisi sul retro della copertina.
- 8.3 Aggiungere i reagenti nel seguente modo:
 - a. **Provette per il conteggio totale**
Mettere da parte fino all'esecuzione della fase 6 (usate per i calcoli del controllo qualità - vedere la sezione Controllo di qualità)
 - b. **Provette per legame non specifico (NSB)**
200 μ L di calibratore 0 per provetta
 - c. **Calibratore 0**
200 μ L di calibratore 0 per provetta
 - d. **Calibratori EPO-Trac (1-5)**
200 μ L di calibratore per provetta
 - e. **Controlli e campioni non noti**
200 μ L di ogni campione o controllo per provetta
- 8.4 Aggiungere 100 μ L di anticorpo di capra primario EPO (blu) in ogni provetta, eccetto le provette per il conteggio totale e NSB.
- 8.5 Agitare lentamente le provette nel Vortex e lasciare in incubazione per 2 ore (± 10 minuti) a temperatura ambiente (20-25°C).
- 8.6 Aggiungere 100 μ L di tracciante EPO (rosso) in tutte le provette.
- 8.7 Agitare lentamente le provette nel Vortex e lasciare in incubazione per 16-24 ore e 2-8°C.
- 8.8 Mescolare energicamente il DAG-PPT prima di distribuirlo. Agitare energicamente o mescolare DAG-PPT con un piccolo agitatore magnetico a velocità molto bassa mentre si distribuiscono 500 μ L in tutte le provette, eccetto le provette per il conteggio totale.
- 8.9 Agitare nel Vortex; lasciare quindi in incubazione le provette per 30 (± 5) minuti a temperatura ambiente (20-25°C).
- 8.10 Centrifugare le provette per 20 minuti a 1600 x g* a 20-25°C.
- 8.11 Mettere da parte le provette per il conteggio totale; far quindi decantare i liquidi superficiali dalla provette rimanenti in un adeguato contenitore per rifiuti radioattivi. Asciugare su carta assorbente le provette capovolte per rimuovere eventuali gocce di liquido superficiale che possono essere rimaste sui bordi prima di riportarle in posizione verticale.
- 8.12 Usando un contatore ad emissione di scintille gamma, contare per un 1 minuto il precipitato in ogni provetta di analisi e nelle provette per il conteggio totale.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$$

9. COMMENTI ALLA PROCEDURA

- 9.1 Aggiungere ogni aliquota di reagente al terzo inferiore delle provette di analisi al fine di garantire una miscela completa di reagenti.
- 9.2 Se non è possibile lasciar decantare le provette nei 5 minuti dopo l'arresto della centrifuga, si consiglia di centrifugare nuovamente le provette prima di far decantare il liquido superficiale.
- 9.3 Per monitorare completamente la costanza e la validità di un'analisi RIA, si possono controllare altri fattori. DiaSorin consiglia di controllare regolarmente i seguenti parametri per garantire prestazioni costanti del kit.
- Conteggi totali**
 - Legame massimo**
Conteggi medi al minuto (CPM) delle provette del calibratore 0/CPM medio delle provette per il conteggio totale.
 - Legame non specifico**
CPM medio delle provette NSB/CPM medio delle provette per il conteggio totale.
 - Pendenza della curva di calibrazione**
Ad esempio, monitorare i punti di soppressione a 80 e 50 e 20% della linea del calibratore.

10. CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni laboratorio deve includere almeno due controlli in ogni analisi per monitorare le performance. Si possono utilizzare i controlli disponibili in commercio o i due controlli di riferimento forniti con il kit. I controlli del kit contengono EPO a due concentrazioni. I controlli del kit sono stati esaminati da DiaSorin utilizzando il kit ¹²⁵I RIA EPO-Trac. Il range delle concentrazioni di ogni controllo è riportato sul certificato di analisi ed indica i limiti stabiliti da DiaSorin per i valori di controllo ottenibili in sessioni di analisi affidabili. Conservare le tabelle per il controllo della qualità al fine di verificare le performance dei controlli. Limiti accettabili per le performance verranno stabiliti da ogni singolo laboratorio per ogni livello di controllo utilizzando metodi basati su statistiche ideati per rilevare errori sistematici e casuali. I risultati dei controlli devono corrispondere ai criteri del laboratorio per quanto concerne l'accettabilità prima di riferire i risultati dei test ai pazienti.^{19, 20, 21}

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Esistono molti metodi per calcolare i risultati di RIA, ognuno tende ad ottenere una curva di calibrazione mediante tracciamento dell'estensione del legame rispetto alle concentrazioni indicate dei calibratori. Il grafico può essere su scala lineare o logaritmica. Ciascun metodo dà essenzialmente gli stessi valori per i controlli e i campioni, anche se certe analisi possono essere più "adatte" per un particolare metodo rispetto ad un altro. Il metodo di calcolo del Laboratorio di controllo qualità di DiaSorin è % di B/B₀ [quantità di tracciante legato da campione (B), diviso per la quantità di tracciante legato dal calibratore zero (B₀) x 100] (vedere fase 3 più avanti) rispetto alla concentrazione di log.

- 11.1 Calcolare il CPM medio per ogni calibratore, controllo e campione non noto.
- 11.2 Sottrarre il CPM medio delle provette NSB da tutti i conteggi.
- 11.3 Dividere il CPM corretto di ogni calibratore, controllo o campione per il CPM corretto del calibratore 0.

$$\% B/B_0 = \frac{\text{CPM del calibratore o campione non noto} - \text{CPM di NSB}}{\text{CPM del calibratore 0} - \text{CPM di NSB}} \times 100$$

- 11.4 Utilizzando carta millimetrata per modello semi-logaritmico a tre cicli, tracciare la percentuale di B/B_0 per i calibratori EPO-Trac (asse verticale) rispetto alla concentrazione stampata sul foglio delle specifiche per il controllo di qualità (asse orizzontale).
- 11.5 Tracciare una linea di miglior interpolazione fra i punti (FIGURA 1).
- 11.6 Interpolare i livelli di eritropoietina nei campioni non noti.
- 11.7 Se qualche campione dà una lettura di <4.4 mU/mL, la soglia di rivelazione di questo test, riportare il valore come <4.4 mU/mL.
- 11.8 Se un campione non noto dà una lettura maggiore rispetto al calibratore superiore, il campione dovrà essere diluito con il calibratore 0 EPO-Trac, N. Cat. 23211 e analizzato nuovamente. Diluizioni di 1:2 e 1:5 saranno sufficienti per la maggior parte dei campioni.

12. LIMITI DELLA PROCEDURA

- 12.1 I risultati di questa analisi dovranno essere usati unitamente alle informazioni disponibili da valutazioni cliniche e altre procedure diagnostiche.
- 12.2 Non sono state studiate le interferenze di farmaci.

TABELLA II
Dati campione DiaSorin EPO-Trac™ RIA

Provetta	CPM (mU/mL)	CPM medio	Media (CPM-NSB) (B)	Percent. legato (B/T)**	Percent. legato (B/B ₀)	Conc. (mU/mL)	* Conc. Corr.
Conteggio totale	14,823						
(T)14,270	14,546						
NSB	492						
	447	470		3.2**			
Calibratore 0	4,783						
	4,904	4,844	4,374 (B ₀)	33**	100.0	0	
Calibratori							
1	4,321						
	4,273	4,297	3,827		87.5	9.0	
2	3,832						
	3,773	3,803	3,333		76.2	19.0	
3	2,896						
	2,920	2,908	2,438		55.7	39.0	
4	1,645						
	1,669	1,657	1,187		27.1	83.0	
5	865						
	932	898	428		9.8	290.0	
Livello di controllo 1	3,924						
	3,877	3,901	3,431		74.4	16.9	
Livello di controllo 2	1,918						
	1,935	1,927	1,457		33.3	69.3	
UKN N. 1	1,217						
	1,232	1,225	755		17.3	127	
1:2	1,832						
	1,873	1,853	1,383		31.6	72.6	124.8
UKN N. 2	1,508						
	1,437	1,472	1,002		22.9	96.6	
1:2	2,264						
	2,309	2,286	1,816		41.5	56.0	91.6

I dati di campioni tipici e una curva di calibratore sono riportati nella TABELLA II e nella FIGURA 1; queste informazioni servono solo a scopo di riferimento e non devono essere usate per il calcolo dei valori.

* Conc. corr. = Concentrazione corretta; solo per i campioni diluiti.

** Questi parametri sono monitorati per il controllo della qualità (vedere la sezione Controllo di qualità).

ESEMPIO DI CURVA DI CALIBRAZIONE EPO

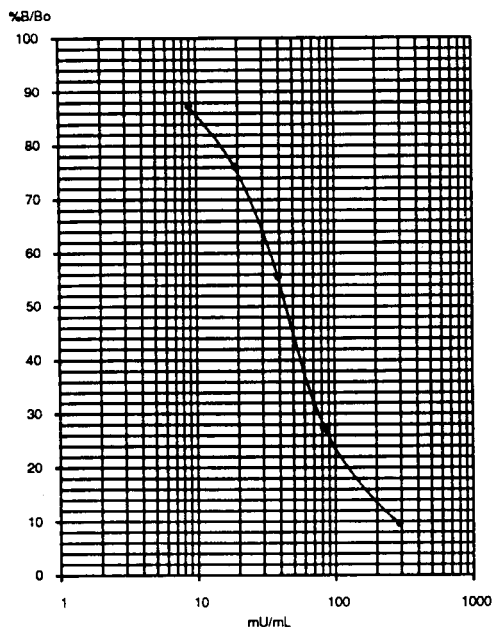


FIGURA 1

* Questo grafico è ottenuto sulla base di dati campione (TABELLA II) e serve solo per riferimento. Non usarlo per calcolare i valori delle vostre analisi.

13. VALORI PREVISTI

13.1 Range normale

Ogni laboratorio deve stabilire un range di riferimento proprio.

I livelli di eritropoietina nel siero sono stati misurati su 104 uomini e donne sani (45 M, 61 F) di Minneapolis, Minnesota utilizzando EPO-Trac RIA. Il valore EPO medio è stato notato essere 17.7 ± 7.5 mU/mL. I valori individuali variavano da un minimo di 4.9 ad un massimo di 52.7 mU/mL. Il valore medio di EPO nel siero per le donne sane era 18.3, mentre era di 16.6 mU/mL per gli uomini sani. Non è stata osservata alcuna differenza statistica ($p = 0.27$) fra i livelli EPO di uomini e donne.

Diversi altri studi su soggetti sani, in cui sono state eseguite RIA EPO, hanno rilevato livelli EPO medi simili in grandezza allo studio suddetto.^{2, 4, 5} In alcuni di questi studi si sono rilevate differenze piccole ma significative fra gli uomini e le donne, dove le donne presentavano valori leggermente superiori a quelli degli uomini.^{8, 9} I risultati di questi studi sono riepilogati nella tabella che segue:

Studio	Sesso	n=	Media \pm 1 S.D.
Koeffler 1981 ²	entrambi	26	$14,9 \pm 4,2$ mU/mL
Garcia 1982 ⁴	uomini	364	$17,2 \pm 5,5$ mU/mL
	donne	199	$18,8 \pm 6,2$ mU/mL
Ryner 1989 ⁵	uomini	50	$8,0 \pm 3,2$ mU/mL
	donne	50	$11,3 \pm 3,4$ mU/mL

13.2 VALORI PER STATI DI MALATTIA

Concentrazioni anomale di EPO in circolo, se esaminate assieme ad altre informazioni cliniche, possono essere indicative di condizioni di malattie specifiche.

Pazienti affetti da policitemia rubra vera presentano solitamente livelli di EPO normali o bassi se misurati con RIA interni.^{8,9} Pazienti affetti da policitemia secondaria causata da ipossia, come nei casi di insufficienza cardiaca congestizia o affezioni polmonari ostruttive croniche, presentano livelli elevati di EPO.^{3,8,9} La produzione di EPO ectopica talvolta può produrre livelli elevati di EPO sierico e conseguente policitemia secondaria in pazienti affetti da mioma uterino, emangioblastoma cerebellare, carcinoma epatico e feocromocitoma. I tumori renali, compresi ipernefroma, adenoma e sarcoma, possono causare eritrocitosi correlata ad EPO.²

La maggior parte dei pazienti anemici presenta livelli sierici di EPO elevati, anche se l'estensione dell'innalzamento dipende dal grado e tipo di anemia. Innalzamenti di EPO sierico possono verificarsi in pazienti affetti da anemia falciforme o infezione da HIV anche se i livelli di EPO, in media, sono meno pronunciati rispetto ad altre forme di anemia.^{10,11}

Si ritiene che le anemie rilevate in pazienti affetti da malattie renali risultino da una produzione carente di eritropoietina da parte di reni malati o mancanti. Pazienti anemici in dialisi per mancanza di rene presentano livelli di EPO bassi o non individuabili.¹² D'altra parte, i pazienti dialisi-dipendenti, con malattie renali allo stadio finale, normalmente hanno livelli di EPO sierico normali o elevati. Si ritiene che i livelli di EPO sierico rilevati in questa tipologia di pazienti, tuttavia, siano inadeguatamente bassi per il loro grado di anemia.^{12,13} Pazienti che hanno subito da poco un trapianto di reni talvolta presentano EPO sierico elevato in risposta alla loro anemia.¹⁴

In uno studio clinico condotto a Minneapolis, Minnesota, i livelli di EPO sono stati misurati con RIA EPO-Trac in 28 pazienti in dialisi con malattia renale allo stadio finale. I livelli medi di EPO sierico erano 38.4 ± 67.1 mU/mL (range: 10.4-360.6 mU/mL), mentre i livelli medi di emoglobina erano 9.4 ± 1.6 g/dL (range: da 6.9 a 12.3 g/dL). Questo valore è stato considerato inadeguatamente basso per una popolazione di pazienti con grado equivalente di anemia, però con funzione renale normale.^{12,15} Questo studio ha confermato le conclusioni di altri ricercatori sulla carenza relativa di eritropoietina in pazienti dialisi-dipendenti.^{15,16} Inoltre, i livelli di eritropoietina sono stati esaminati in vari gruppi di pazienti. La tabella che segue indica i livelli medi di EPO misurati. I controlli sono stati selezionati casualmente dalla popolazione di pazienti presa in esame.

Tabella riepilogativa di livelli medi di EPO in vari gruppi di pazienti con uso del kit EPO-Trac RIA

Diagnosi	n	Media EPO (mU/mL)	S.D.
Soggetti sani	36	15,7	10,5
Controlli Pazienti	18	18,6	11,3
Pazienti in dialisi	28	38,4	67,1
Mielodisplasia	2	651,0	887,2
Mielofibrosi	2	116,0	147,5
Aplasia/Ipplasia eritroide	4	1545	1213
Linfoma non Hodgkin	15	26,4	13,8
Morbo di Hodgkin	3	29,8	31,3
Leucemia linfocita cronica	3	17,4	9,7
Macroglobulinemia	2	30,2	15,1
Mieloma	3	49,7	52,3
Anemia emolitica	3	51,4	29,2
Anemie varie	10	32,2	18,9
Pazienti eritrocitoti	6	14,6	8,5
Policitemia Vera	6	20,7	4,9

I livelli di eritropoietina indicati nella tabella possono essere compatibili o meno con gli stati di malattie elencati. Tutti i pazienti erano in stadi diversi di cura, i quali possono alterare il livello di eritropoietina previsto per lo stato di affezione specifico. Nell'interpretazione di livelli di eritropoietina specifici, si deve tenere in considerazione lo stato del singolo paziente e le condizioni del sistema eritropoietico.

14. DATI SULLE PERFORMANCE

14.1 Riproducibilità

Variazioni intra-analisi Siero (Valori = mU/mL)

	Valore medio	D.S.	(% C.V.)**	N
BASSO	11,1	1,3	11,9	20
BASSO	12,4	1,2	10,0	20
BASSO	22,9	1,2	5,2	10
MEDIO	39,9	1,9	4,8	10
ALTO	106,5	5,1	4,8	10
ALTO	254,6	29,8	11,7	20

Variazioni intra-analisi Siero (Valori = mU/mL)

	Valore medio	D.S.	(% C.V.)**	N
BASSO	9,8	1,4	14,3	5
BASSO	13,2	1,6	12,1	5
BASSO	19,0	1,3*	6,7	5
MEDIO	40,9	1,4	3,5	5
ALTO	147,6	15,7	10,6	5
ALTO	220,2	26,9	12,2	5

* I campioni sono stati analizzati in cinque analisi separate (n = 5)

** % C.V. = (D.S. ÷ Media) 100

14.2 ACCURATEZZA: L'ACCURATEZZA DELL'ANALISI È STATA CONTROLLATA MEDIANTE TEST DI LINEARITÀ E DI RECUPERO.

Parallelismo diluizione

Studio sulla diluizione seriale di campioni di siero non noti

Campione	Diluizione	EPO Media (mU/mL)	% media/ Media diluizione 0
1	0	15,6*	–
	1:2	17,4	111,5
2	0	127,1	–
	1:2	124,8	98,2
	1:4	141,2	111,1
	1:8	152,0	119,6
3	0	96,6	–
	1:2	91,6	94,8
	1:4	100,4	103,9
	1:8	100,0	103,5
4	0	51,3	–
	1:2	52,8	102,9
	1:4	38,4	74,9
			Media = 102,3

* I valori di diluizione zero erano valori misurati prima della diluizione con diluente sierico DiaSorin.

Precisione

Studio del recupero

Siero (Valori = mU/mL)

Set N. 1	Fondo*	Calibratore EPO aggiunto	Valore misurato**	Percentuale di recupero***
1	8,9	19,5	27,3	94,4
	8,9	41,5	51,9	103,6
	8,9	145,0	182,0	119,4
2	18,1	19,5	37,3	98,5
	18,1	41,5	66,0	115,4
	18,1	145,0	205,6	129,3
3	44,3	19,5	62,9	95,4
	44,3	41,5	87,6	104,3
	44,3	145,0	158,5	78,8
4	80,8	19,5	101,3	105,1
	80,8	41,5	127,1	111,6
	80,8	145,0	210,7	89,6
				Media = 103,8

* Valore campione analizzato diviso per 2.

** Volume uguale di calibratore EPO-Trac 3, 4 e 5, e campione paziente combinati.

*** % di recupero = [(misurato-fondo)/EPO aggiunto] x 100

14.3 Sensibilità analitica (Limiti di rilevazione)

La concentrazione minima rilevabile di EPO è 4.4 mU/mL, se definita come concentrazione apparente a 3 deviazioni del calibratore dai conteggi a legame massimo o zero. Letture di campioni non noti inferiori alla sensibilità di questa analisi devono essere indicati con <4.4 mU/mL.

14.4 Specificità analitica

I risultati ottenuti da un esperimento sulla reattività incrociata con utilizzo del sistema EPO-Trac RIA e 8 proteine naturalmente presenti nel siero hanno indicato <0.001% di reattività incrociata se misurata alla sensibilità dell'analisi (4.4 mU/mL).

Sostanze	% di reattività incrociata
Albumina umana	<0,001
Fattore di stimolazione delle colonie di granulociti (GM-CSF)	<0,001
Interleuchina-3	<0,001
Antitripsina alfa-1	<0,001
Gonadotropina corionica umana	<0,001
Alfa-1 glicoproteina acida	<0,001
IgG umano	<0,001
IgM umano	<0,001

La sequenza genetica dell'eritropoietina è stata confrontata con tutte le sequenze genetiche umane della Banca Genetica e dei database EMBL. Dalla ricerca non è stato trovato alcun gene significativamente simile alla sequenza genetica dell'eritropoietina.

14.5 Interferenza

Sono stati presi in esame studi secondo le metodiche CLSI al fine di stabilire l'interferenza di emoglobina, trigliceridi e bilirubina. Tali studi affermano che non è stata osservata alcuna interferenza.

14.6 Tipi di campioni

Campioni accoppiati di EDTA nel plasma e siero si sono dimostrati essere altamente correlati.

Y (SIERO) = $0,9 + 0,993$ (PLASMA); $r = 0,93$ (range: 4,7 - 42,5 mU/mL; siero).

FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA PER LA BIBLIOGRAFIA

KIT RIA EPO-Trac ¹²⁵I

1. USO INDICADO

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

O kit RIA EPO-Trac™ destina-se a ser utilizado na determinação quantitativa da eritropoietina (EPO) no soro ou plasma EDTA através de radioimunoensaio (RIA) para auxiliar no diagnóstico de anemias e de policitemias.

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

A eritropoietina (EPO) é uma hormona da glicoproteína (34.000 daltons) que estimula a maturação dos precursores dos glóbulos vermelhos. A EPO é segregada pelos rins em resposta ao conteúdo de oxigénio presente no sangue. Normalmente, quando os níveis de oxigénio decaem, tal como acontece na hipóxia fisiológica, o nível de EPO no sistema circulatório aumenta e estimula uma maior produção de glóbulos vermelhos.¹

Os níveis anormais de EPO em circulação no sangue são característicos de desordens patológicas específicas que incluem diversas anemias, policitemia e tumores. A produção excessiva da EPO tem sido associada aos carcinomas renais. Alguns tumores do fígado e de outros órgãos também têm sido associados à produção da eritropoietina ectópica.²

A anemia caracteriza-se por níveis inadequados de glóbulos vermelhos.² Os pacientes anémicos que se apresentam com níveis elevados de EPO incluem pacientes com anemia aplástica, anemia por insuficiência de ferro e anemia hemolítica. A anemia associada a uma insuficiência renal crónica é o resultado da produção insuficiente de EPO nos rins.

A produção excessiva de glóbulos vermelhos é designada por policitemia. Na policitemia rubra vera não tratada, a produção excessiva de glóbulos vermelhos pelos progenitores hematopoiéticos ocorre na presença de concentrações baixas ou indetectáveis de EPO.³

A policitemia secundária (stress) é provocada pela maior produção e libertação da EPO resultando no aumento da massa celular de glóbulos vermelhos. A policitemia secundária pode ser provocada por diversos factores tais como o tabaco, pedra nos rins, fibrose pulmonar, doenças do foro cardíaco, tumores ou insuficiência de hemoglobina.²

Foram desenvolvidos diversos métodos para medir a eritropoietina nos seres humanos e nos animais. Os primeiros ensaios desenvolvidos incluíam um bioensaio *in vivo* utilizando ratos vivos policitémicos exipóxicos.^{4,5} Com o desenvolvimento da eritropoietina humana recombinante, começaram a desenvolver-se os ensaios *in vitro*, os quais são mais rápidos e menos dispendiosos. Estes ensaios *in vitro* incluem o radioimunoensaio (RIA) e o imunoensaio enzimático (EIA).

3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O procedimento do RIA EPO-Trac ¹²⁵I da DiaSorin é um radioimunoensaio de desequilíbrio, com ligação competitiva que utiliza eritropoietina humana recombinante para o traçador e para os calibradores. As amostras são incubadas com o anticorpo de cabra primário EPO-Trac (anti-EPO de cabra) sendo permitida uma reacção durante 2 horas antes de ser adicionado traçador EPO-Trac com iodo-125. Depois de uma incubação durante a noite, o anticorpo secundário de complexo precipitante anti-cabra de burro (DAG-PPT) é adicionado aos tubos de ensaio específicos do ensaio (TABELA I). O DAG-PPT é um soro anti-cabra de burro, o qual é previamente precipitado com um soro normal de cabra e um surfactante. O DAG-PPT é incubado com calibradores ou amostras, anticorpo primário e traçador, durante trinta minutos antes dos tubos de ensaio serem centrifugados para separar o traçador ligado do traçador não ligado. O traçador não ligado é removido por meio da decantação do sobrenadante de cada tubo de ensaio. O traçador ligado nas restantes pastilhas de complexo DAG-PPT é contado num contador gama durante 1 minuto. As contagens de ¹²⁵I são inversamente proporcionais à quantidade de EPO presente em cada amostra.

4. REAGENTES FORNECIDOS NO KIT

Anticorpo primário EPO-Trac (AZUL)	1 frasco/11 mL
Calibradores EPO-Trac (0-5)	1 frasco/11 mL, 5 frascos/2,1 mL
DAG-ppt EPO-Trac	2 frascos/35 mL
Traçador EPO-Trac (VERMELHO)	1 frasco/11 mL
Controlos EPO-Trac	2 frascos/2,1 mL
Número de testes	100

ARMAZENAMENTO: Ao ser recebido, o kit deve ser armazenado a 2-8°C. Depois de abrir, armazene cada reagente a 2-8° até ao prazo de validade indicado no rótulo. Os reagentes não devem ser usados após o prazo de validade. O prazo de validade do kit é indicado no rótulo externo e corresponde ao prazo de validade do traçador.

Não misture reagentes de lotes diferentes.

4.1 Calibradores EPO-Trac, 0-5: reagente pronto a usar

Seis calibradores de eritropoietina recombinados, em concentrações nominais entre cerca de 0 e 280 mU/mL, são pré-diluídos em salina tampão com estabilizantes proteicos, antimicrobianos e 0,1% de azida de sódio. Os calibradores estão referenciados em relação à 2ª Eritropoietina IRP da Organização Mundial de Saúde (OMS), HUM, Bioensaio/Urínario 67/343⁶ e ao Calibrador Internacional para a Eritropoietina da OMS (IS), DNA Recombinado (rDNA) - código derivado #87/684. Os calibradores do kit demonstram permutabilidade com as amostras dos pacientes quando utilizados com reagentes e procedimentos operacionais deste teste diagnóstico *in vitro*, tal como recomendado.

4.2 ¹²⁵I EPO-Trac: reagente pronto a usar

A eritropoietina recombinada humana é rotulada com iodo-125, 2 µCi (74 kBq), e diluída em salina tampão com estabilizantes proteicos, antimicrobianos, 0,1% de azida de sódio e corante vermelho N° 40 da Food, Drug and Cosmetic (FD & C).

4.3 Anticorpo primário EPO-Trac: reagente pronto a usar

O soro EPO anti-humano de cabra é diluído em salina tampão com estabilizantes proteicos, antimicrobianos e 0,1% de azida de sódio com corante azul N° 1 da FD & C.

4.4 Complexo precipitante, DAG-PPT EPO-Trac: reagente liofilizado

O soro anti-cabra de burro é previamente precipitado com soro normal de cabra e surfactante, diluído em tampão de borato-BSA com antimicrobianos, 0,03% de timerosal e liofilizado. Reconstitua o frasco com 35 mL de água purificada; misture bem até que a suspensão pareça homogênea e deixe-a descansar durante um mínimo de 30 minutos à temperatura ambiente, misturando ocasionalmente. Agite ou misture com um pequeno agitador magnético, a velocidade muito reduzida enquanto deita o DAG-PPT nos tubos de ensaio. Se os reagentes apresentarem sinais de rehidratação antes do uso, não utilize.

4.5 Controlos EPO-Trac, Níveis 1 e 2: reagente pronto a usar

O EPO recombinado humano é adicionado a salina tampão com estabilizantes proteicos para obter uma concentração dentro do intervalo especificado, indicado no Certificado de Análise. São adicionados 0,1% de azida de sódio e outros estabilizantes.

5. AVISOS E PRECAUÇÕES

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*.

Não recomendado para o uso interno ou externo em seres humanos ou animais.

REAGENTES COM AZIDA DE SÓDIO

CUIDADO: Alguns reagentes neste kit contêm azida de sódio. A azida de sódio pode reagir com chumbo ou cobre para formar azidas de metal altamente explosivo. Ao eliminar, lave com grande quantidade de água para impedir a formação de azida. Para mais informações, consulte "Descontaminação de drenos de pias de laboratórios para remover sais de azidas," no Manual Guia-Gestão de Segurança N° CDC-22 emitido pelos Centros de Controlo e Prevenção de Doenças, Atlanta, GA, EUA 1976.

Frases de Risco de Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia (Directiva do Conselho 1999/45/EC)

R20/21/22 - Nocivo pela inalação, em contacto com a pele e se ingerido.

R32 - O contacto com ácidos liberta gás muito tóxico.

S28 - Após contacto com a pele, lave imediatamente com água em abundância.

REAGENTES COM TIMEROSAL

Alguns reagentes deste kit contêm timerosal, o qual é constituído por um composto de mercúrio. A eliminação do mercúrio, do mercúrio inorgânico, dos óxidos de mercúrio e dos compostos de mercúrio deve ser efectuada respeitando todas as normas locais, estaduais e federais.

ADVERTÊNCIA: Este produto contém um elemento químico considerado pelo Estado da Califórnia como causador de deficiências à nascença ou de outros danos reprodutivos.

REAGENTES COM IODO-125

Este kit contém material radioactivo que não excede 2 µCi (74 kBq) de iodo-125. Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e usadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseamento e eliminação deste material.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença geral:

Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática de medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínicos *in vitro* que não envolvam a administração interna ou externa do material, ou a radiação deste para seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos do estado com o qual a Comissão entrou em acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve ser limitado a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve ser limitado apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo por via oral.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.
5. As áreas onde possam ocorrer fugas devem ser limpas e de seguida lavadas com detergente alcali ou solução de descontaminação radiológica. Qualquer vidro utilizado deve ser totalmente enxaguado em água antes de lavar qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença específica:

A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições de sua licença específica.

ADVERTÊNCIA: Este produto contém um elemento químico que provoca cancro, segundo o Estado da Califórnia.

ATENÇÃO: O símbolo de radioactividade impresso na embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indicam a quantidade real de radioactividade na data de calibragem enquanto a embalagem indica a radioactividade teórica no kit.

ADVERTÊNCIAS ADICIONAIS

1. Evite derramamentos ou a geração de aerossóis.
2. Os períodos e temperaturas de incubação diferentes dos especificados poderão fornecer resultados incorrectos.
3. A contaminação microbiana dos reagentes poderá fornecer resultados incorrectos.
4. Não substitua os reagentes com reagentes de outros lotes ou de outros fabricantes.

6. REQUISITOS DO ESPÉCIME

CUIDADO: Os espécimes dos pacientes e todos os outros materiais que entrem em contacto com eles devem ser manuseados como se fossem transmissores de infecções e eliminados com as devidas precauções.

RECOLHA E ARMAZENAMENTO DO SORO OU PLASMA

Deve-se recolher uma amostra adequada de sangue, de forma asséptica, através de venipunctura, num tubo de vidro estéril evacuado de 5 ou 10 mL para produzir um mínimo de 400 µL de soro ou plasma EDTA por ensaio (para 2 réplicas). Deve-se ter o cuidado de remover imediatamente o soro do coágulo por meio de centrifugação de forma a evitar a hemólise. Centrifugue o soro ou plasma à temperatura ambiente durante 10 minutos a 760 x g*. O EDTA (72 mg/5 mL de sangue) deve ser usado tal como o anticoagulante para o plasma. Não são necessários outros aditivos ou conservantes para manter a integridade da amostra.

O soro ou plasma EDTA devem ser colocados em tubos de armazenamento tapados e estéreis. O soro é estável durante 7 dias a uma temperatura de 4°C. Para armazenar durante períodos de tempo mais prolongados, congele a -20°C num congelador sem descongelação automática. Estudos efectuados pela DiaSorin demonstraram que as amostras de soro permanecem estáveis até um período máximo de 18 meses se forem congeladas continuamente a uma temperatura de -20°C. As amostras de soro não devem ser congeladas e cortadas de forma repetida. Qualquer plástico, vidro ou outro material que entrar em contacto com o espécime deve estar completamente descontaminado.

Apesar de não ser necessário, recomenda-se o uso de amostras em jejum, para evitar a ocorrência de interferências imprevistas de substâncias solúveis em lípidos. As amostras visivelmente hemolisadas devem ser eliminadas. A bilirrubina (<5 mg/dL) não parece interferir com este ensaio. Não se procedeu ao exame de quaisquer fármacos relativamente a possíveis interferências.

7. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS, NÃO FORNECIDOS

- 7.1 Luvas de borracha/látex para usar durante a execução do teste.
- 7.2 Tubos de vidro descartáveis de borossilicato, 12 x 75 mm.
- 7.3 Centrifugador controlado por temperatura (20-25°C) para acomodar tubos de 12 x 75 mm com uma velocidade de centrifugação de 1600 ±20 g*.
- 7.4 Contador de cintilação gama calibrado e capaz de contar iodo-125.
- 7.5 Misturador de vórtice.
- 7.6 Dispositivos para pipetar
 - a. Micropipetadores calibrados para administrar 200 (±4) µL.
 - b. Distribuidores de repetição calibrados para administrar 100 (±2) µL e 500 (±5) µL.
- 7.7 Água purificada para diluir o DAG-PPT.
- 7.8 Temporizador para contar com precisão ±2 minutos.
- 7.9 Papel de gráfico semi-log de três ciclos.

8. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

- 8.1 Prepare as amostras desconhecidas.
- 8.2 Prepare tubos de vidro descartáveis de 12 x 75 mm, devidamente rotulados, em duplicado de acordo com o Esquema do Ensaio, na última página.
- 8.3 Adicione reagentes da seguinte forma:
 - a. **Tubos de contagem total**
Coloque de lado até chegar ao passo 6 (usados para cálculos de controlo de qualidade - consulte a secção Controlo de Qualidade)

$$* g = (1118 \times 10^{-6}) (\text{raio em cm (rpm)})^2$$

- b. Tubos de ligação não específica (NSB)**
200 µL de calibrador 0 por tubo
 - c. Calibrador 0**
200 µL de Calibrador 0 por tubo
 - d. Calibradores EPO-Trac (1-5)**
200 µL de calibrador por tubo
 - e. Controlos e amostras desconhecidas**
200 µL de cada amostra ou de controlo por tubo
- 8.4** Adicione 100 µL de anticorpo de cabra primário da EPO (azul) a cada tubo excepto os tubos de contagem total e os tubos NSB.
 - 8.5** Misture os tubos com cuidado e incube durante 2 horas (± 10 minutos), à temperatura ambiente (20-25°C).
 - 8.6** Adicione 100 µL de traçador EPO (vermelho) a todos os tubos.
 - 8.7** Misture cuidadosamente os tubos e incube durante 16-24 horas a 2-8°C.
 - 8.8** Misture vigorosamente com o DAG-PPT antes de deitar. Agite ou misture o DAG-PPT com um pequeno agitador magnético a uma velocidade muito reduzida, deitando em simultâneo 500 µL em todos os tubos excepto os tubos de contagem total.
 - 8.9** Misture; de seguida incube os tubos durante 30 (± 5) minutos à temperatura ambiente (20-25°C).
 - 8.10** Centrifugue os tubos durante 20 minutos usando 1600 x g* a 20-25°C.
 - 8.11** Coloque de lado os tubos de contagem total; de seguida decante o sobrenadante dos restantes tubos para um recipiente adequado para a eliminação de desperdícios radioactivos. Seque os tubos virados ao contrário utilizando papel absorvente para remover todas as gotas de sobrenadante que possam ter permanecido nas beiras antes de pôr os tubos na sua posição direita.
 - 8.12** Utilizando um contador de cintilação gama, conte o precipitado de cada tubo e os tubos de contagem total durante 1 minuto.
- 9. COMENTÁRIOS SOBRE O PROCEDIMENTO**
- 9.1** Adicione cada alíquota de reagente ao terço inferior dos tubos de ensaio para assegurar a mistura completa dos reagentes.
 - 9.2** Se não conseguir decantar os tubos num período de 5 minutos após a conclusão da centrifugação, os tubos deverão ser novamente centrifugados antes de decantar o sobrenadante.
 - 9.3** Para monitorizar completamente o desempenho consistente de um RIA há diversos factores a ter em conta. A DiaSorin sugere a verificação regular dos parâmetros seguintes para assegurar o desempenho consistente do kit.
 - a. Contagens totais**
 - b. Ligação máxima**
Contagens médias por minuto (CPM) dos tubos com calibrador 0 / CPM média dos tubos de contagem total.
 - c. Ligação não específica**
CPM média dos tubos NSB / CPM média dos tubos de contagem total.
 - d. Inclinação da curva do calibrador**
Por exemplo, monitorize os pontos de supressão de 80%, 50% e 20% da linha do calibrador.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raio em cm (rpm)})^2$$

10. CONTROLO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve incluir pelo menos dois controlos em cada ensaio para monitorizar o desempenho do ensaio. Podem ser utilizados controlos comercialmente disponíveis ou os dois controlos de referência fornecidos com o kit. Os controlos do kit contêm EPO em duas concentrações. Os controlos do kit foram avaliados pela DiaSorin usando o kit RIA EPO-Trac ¹²⁵I DiaSorin. O intervalo de concentrações de cada controlo é referido no certificado de análise e indica os limites estabelecidos pela DiaSorin para os valores de controlo que podem ser obtidos em ensaios fidedignos. Mantenha tabelas de controlo de qualidade para acompanhar o desempenho do controlo. Os limites aceitáveis de desempenho devem ser determinados por cada laboratório individual para cada nível de controlo utilizando métodos baseados em estatísticas, concebidos para detectar erros sistemáticos e erros aleatórios. Os resultados do controlo devem ter em consideração os critérios de aceitabilidade do laboratório antes de relatar os resultados de testes dos pacientes.^{19,20,21}

11. CÁLCULO DE RESULTADOS

Existem vários métodos para calcular resultados de RIAs. Todos se baseiam na obtenção de uma curva de calibragem através da marcação da extensão da ligação em relação às concentrações declaradas dos calibradores. Este gráfico pode estar em escala linear ou logarítmica. Cada um destes métodos fornece essencialmente os mesmos resultados para controlos e para amostras, apesar de determinados ensaios se poderem “encaixar” melhor num método em particular do que outros. O método de cálculo do Laboratório do Controlo de Qualidade da DiaSorin é % B/B₀ [quantidade de traçador ligado pela amostra (B), dividido pela quantidade de traçador ligado pelo calibrador zero (B₀) x 100] (consulte o passo 3 a seguir) em relação à concentração do registo.

- 11.1 Calcule a média (CPM) para cada calibrador, controlo e amostra desconhecida.
- 11.2 Subtraia o CPM médio dos tubos de Ligação Não Específica (NSB) a todas as contagens.
- 11.3 Divida o CPM corrigido de cada calibrador, controlo ou amostra, pelo CPM corrigido do Calibrador 0.

$$\% B/B_0 = \frac{\text{CPM do calibrador ou de amostra desconhecida} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM do calibrador 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

- 11.4 Usando papel gráfico semi-log de três ciclos, marque a percentagem B/B₀ para os calibradores EPO-Trac (eixo vertical) em relação à concentração impressa na ficha de especificações do controlo de qualidade (eixo horizontal).
- 11.5 Desenhe a linha de melhor ajuste através dos pontos (FIGURA 1).
- 11.6 Faça a interpolação dos níveis de eritropoietina nas amostras desconhecidas a partir do gráfico.
- 11.7 Se alguma amostra desconhecida apresentar leituras de <4,4 mU/mL, o limite de detecção deste teste, relate o valor como sendo de <4,4 mU/mL.
- 11.8 Se alguma amostra desconhecida apresentar leituras superiores ao calibrador mais alto, deverá ser diluída com Calibrador 0 EPO-Trac, Cat. N.º. 23211 e novamente ensaiada. As diluições de 1:2 e de 1:5 serão suficientes para grande parte das amostras.

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- 12.1 Os resultados deste ensaio devem ser utilizados em conjugação com as informações disponíveis obtidas em avaliações clínicas e outros procedimentos de diagnóstico.
- 12.2 Não foram testados quaisquer fármacos relativamente a interferências no ensaio.

TABELA II
Dados da Amostra RIA EPO-Trac™ DIASORIN

Tubo	CPM (mU/mL)	Média CPM	Média (CPM-NSB) (B)	Percentagem Ligada (B/T)**	Percentagem Ligada (B/B ₀)	Conc. (mU/mL)	*Conc. Corr.
Contagem Total	14.823						
(T)14,270	14.546						
NSB	492						
	447	470		3,2**			
Calibrador 0	4.783						
	4.904	4.844	4.374 (B ₀)	33**	100,0	0	
Calibradores							
1	4.321						
	4.273	4.297	3.827		87,5	9,0	
2	3.832						
	3.773	3.803	3.333		76,2	19,0	
3	2.896						
	2.920	2.908	2.438		55,7	39,0	
4	1.645						
	1.669	1.657	1.187		27,1	83,0	
5	865						
	932	898	428		9,8	290,0	
Nível de controlo 1	3.924						
	3.877	3.901	3.431		74,4	16,9	
Nível de controlo 2	1.918						
	1.935	1.927	1.457		33,3	69,3	
UKN Nº 1	1.217						
	1.232	1.225	755		17,3	127	
1:2	1.832						
	1.873	1.853	1.383		31,6	72,6	124,8
UKN Nº 2	1.508						
	1.437	1.472	1.002		22,9	96,6	
1:2	2.264						
	2.309	2.286	1.816		41,5	56,0	91,6

Os dados típicos da amostra e do calibrador são apresentados na TABELA II e na FIGURA 1; estas informações servem apenas como referência e não deverão ser utilizadas para o cálculo de qualquer valor.

* Conc. corr. = Concentração corrigida; apenas para amostras diluídas.

** Estes parâmetros são monitorizados para efectuar o controlo de qualidade (consulte a secção Controlo de Qualidade).

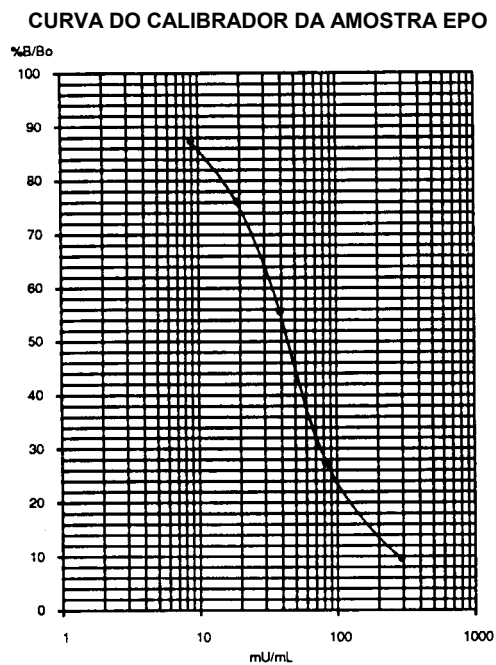


FIGURA 1

* Este gráfico é gerado a partir dos Dados da Amostra (TABELA II) servindo apenas de referência. Não o utilize para efectuar o cálculo dos valores do ensaio.

13. VALORES ESPERADOS

13.1 Intervalo Normal

CADA LABORATÓRIO DEVE ESTABELEECER O SEU PRÓPRIO INTERVALO NORMAL.

Os níveis de eritropoietina no soro foram medidos em cento e quatro (104) indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino normais (45 M, 61 F) de Minneapolis, Minnesota utilizando o RIA EPO-Trac. O valor médio de EPO situou-se nos 17.7 ± 7.5 mU/mL. Os valores individuais ficaram situados entre um mínimo de 4.9 e um máximo de 52.7 mU/mL. O valor médio de EPO no soro para indivíduos normais do sexo feminino foi de 18.3, tendo ficado por um valor de 16.6 mU/mL nos indivíduos do sexo masculino normais. Não se verificaram diferenças estatísticas ($p = 0.27$) entre os níveis de EPO nos indivíduos do sexo masculino e nos indivíduos do sexo feminino.

Diversos estudos com indivíduos normais, utilizando RIAs EPO internos alcançaram níveis de EPO semelhantes em magnitude ao estudo supramencionado.^{2, 4, 5} Alguns desses estudos descobriram diferenças pequenas mas significativas entre o sexo masculino e o sexo feminino, tendo este último apresentado valores ligeiramente superiores aos do sexo masculino.^{8, 9} Os resultados desses estudos são resumidos na tabela seguinte:

Estudio	Sexo	n=	Media \pm 1 S.D.
Koeffler 1981 ²	ambos	26	14,9 \pm 4,2 mU/mL
Garcia 1982 ⁴	masculino	364	17,2 \pm 5,5 mU/mL
	feminino	199	18,8 \pm 6,2 mU/mL
Ryner 1989 ⁵	masculino	50	8,0 \pm 3,2 mU/mL
	feminino	50	11,3 \pm 3,4 mU/mL

13.2 Valores da condição da doença

As concentrações anormais de EPO em circulação, quando examinadas juntamente com outras informações clínicas, podem ser características de condições específicas de determinadas doenças.

Pacientes com policitemia rubra vera normalmente presente com valores normais ou baixos de EPO sérico, quando medidos com RIAs internos.^{8, 9} Pacientes com policitemia secundária derivada da hipóxia, tal como nas insuficiências cardíacas congestivas ou nas doenças pulmonares obstrutivas crónicas, presente em níveis elevados de EPO.^{3, 8, 9} A produção de EPO ectópica pode, por vezes, resultar em níveis elevados de EPO sérico e na policitemia secundária subsequente nos pacientes com mioma uterino, hemangioblastoma do cerebello, carcinoma hepático e feocromocitoma. Os tumores renais, incluindo o hipernefroma, o adenoma e o sarcoma, poderão resultar numa eritrocitose semelhante relacionada com a EPO.²

Muitos pacientes anémicos possuem níveis elevados de EPO sérico, apesar da extensão do aumento estar dependente do grau e do tipo de anemia. Os aumentos dos níveis de EPO no soro podem ser encontrados em pacientes com anemia da célula falciforme ou infectados com VIH apesar dos níveis de EPO, em média, serem menos pronunciados do que noutras anemias.^{10, 11}

Pensa-se que as anemias típicas dos pacientes com doenças renais possam resultar da produção insuficiente de eritropoietina por rins enfermos ou ausentes. Os pacientes sujeitos a diálise com anemia anéfrica têm níveis baixos ou indetectáveis de EPO.¹² Por outro lado, os pacientes dependentes de diálises, com doença renal na sua fase terminal, têm habitualmente níveis normais ou elevados de EPO no soro. No entanto, os níveis de EPO sérico nesses pacientes, parecem ser inadequadamente baixos para o seu grau de anemia.^{12, 13} Os pacientes submetidos a transplantes recentes dos rins apresentam níveis elevados de EPO sérico em resposta às respectivas anemias.¹⁴

Num estudo clínico efectuado em Minneapolis, Minnesota, os níveis de EPO foram medidos pelo RIA EPO-Trac em vinte e oito (28) pacientes sujeitos a diálise néfrica com doença renal em fase terminal. Os níveis de EPO sérico situaram-se, em média, nos 38,4 \pm 67,1 mU/mL (intervalo: 10,4-360,6 mU/mL), enquanto os níveis de hemoglobina médios foram de 9,4 \pm 1,6 g/dL (intervalo: 6,9 a 12,3 g/dL). Este valor foi considerado como sendo inadequadamente baixo para uma população de pacientes com um grau equivalente de anemia, mas com função renal normal.^{12, 15} Este estudo confirmou as conclusões de outros investigadores de insuficiência relativa de eritropoietina nos pacientes dependentes de diálise.^{15, 16} Adicionalmente, os níveis de eritropoietina foram determinados num determinado número de grupos de pacientes. A tabela seguinte mostra os níveis médios de EPO medidos. Os controlos dos pacientes foram seleccionados de forma aleatória na população de pacientes avaliada.

Tabela de resumo dos níveis médios de EPO em diversos grupos de pacientes utilizando o Kit RIA EPO-Trac

Diagnóstico	n	Média EPO (mU/mL)	D.S.
Normais	36	15,7	10,5
Controlos do paciente	18	18,6	11,3
Pacientes com diálise	28	38,4	67,1
Mielodisplasia	2	651,0	887,2
Mielofibrose	2	116,0	147,5
Hipoplasia/Aplasia Eritróide	4	1545	1213
Linfoma não-Hodgkin	15	26,4	13,8
Doença de Hodgkin	3	29,8	31,3
Leucemia linfocita crónica	3	17,4	9,7
Macroglobulinemia	2	30,2	15,1
Mieloma	3	49,7	52,3
Anemia Hemolítica	3	51,4	29,2
Diversas Anemias	10	32,2	18,9
Pacientes com Eritrocitose	6	14,6	8,5
Pacientes com Policitemia Vera	6	20,7	4,9

Os níveis de eritropoietina apresentados acima poderão, ou não, ser consistentes com os estados das doenças listados. Todos os pacientes se encontravam em diferentes fases dos respectivos tratamentos, o que poderá alterar o nível de eritropoietina para o seu estado específico da doença. Há que ter em consideração o estado individual do paciente e a condição do seu sistema eritropoiético durante a interpretação dos níveis específicos de eritropoietina.

14. DADOS DE DESEMPENHO

14.1 Reprodutibilidade

Varição no ensaio Soro (Valores = mU/mL)

	Valor médio	Desvio padrão	(% C.V.)**	N
BAIXO	11,1	1,3	11,9	20
BAIXO	12,4	1,2	10,0	20
BAIXO	22,9	1,2	5,2	10
MÉDIO	39,9	1,9	4,8	10
ALTO	106,5	5,1	4,8	10
ALTO	254,6	29,8	11,7	20

Varição entre ensaios Soro (Valores = mU/mL)

	Valor médio	Desvio padrão	(% C.V.)**	N
BAIXO	9,8	1,4	14,3	5
BAIXO	13,2	1,6	12,1	5
BAIXO	19,0	1,3*	6,7	5
MÉDIO	40,9	1,4	3,5	5
ALTO	147,6	15,7	10,6	5
ALTO	220,2	26,9	12,2	5

* As amostras foram ensaiadas em cinco ensaios individuais (n = 5)

** % C.V. = (D.S. ÷ Média) 100

14.2 PRECISÃO: A PRECISÃO DO ENSAIO FOI VERIFICADA ATRAVÉS DOS TESTES DE LINEARIDADE E DE RECUPERAÇÃO.

Paralelismo da Diluição

Estudo de Diluição em Série de Amostras Séricas Desconhecidas

Amostra	Diluição	EPO Média (mU/mL)	% média/ Média de diluição 0
1	0	15,6*	—
	1:2	17,4	111,5
2	0	127,1	—
	1:2	124,8	98,2
	1:4	141,2	111,1
	1:8	152,0	119,6
3	0	96,6	—
	1:2	91,6	94,8
	1:4	100,4	103,9
	1:8	100,0	103,5
4	0	51,3	—
	1:2	52,8	102,9
	1:4	38,4	74,9
			Média = 102,3

* Os valores da diluição zero foram valores medidos antes da diluição com o diluente sérico da DiaSorin.

Precisão

Estudo de recuperação Soro (Valores = mU/mL)

Conjunto Nº	Condições*	Calibrador EPO Adicionado	Valor medido**	Porcentagem de recuperação***
1	8,9	19,5	27,3	94,4
	8,9	41,5	51,9	103,6
	8,9	145,0	182,0	119,4
2	18,1	19,5	37,3	98,5
	18,1	41,5	66,0	115,4
	18,1	145,0	205,6	129,3
3	44,3	19,5	62,9	95,4
	44,3	41,5	87,6	104,3
	44,3	145,0	158,5	78,8
4	80,8	19,5	101,3	105,1
	80,8	41,5	127,1	111,6
	80,8	145,0	210,7	89,6
				Média = 103,8

* Valor da amostra ensaiada dividido por 2.

** Volume igual aos calibradores EPO-Trac 3, 4 e 5 combinados com a amostra do paciente.

*** % Recuperação = [(condições da medição)/EPO adicionado] x 100

14.3 Sensibilidade analítica (Limites de Detecção)

A concentração mínima detectável de EPO é de 4,4 mU/mL, quando definida como a concentração aparente com desvios de 3 calibradores das contagens na ligação máxima ou ligação zero. As amostras desconhecidas com leituras inferiores à sensibilidade do ensaio devem ser relatadas como sendo de <4,4 mU/mL.

14.4 Especificidade Analítica

Os resultados dos testes de reactividade cruzada utilizando o sistema RIA EPO-Trac e 8 proteínas séricas de ocorrência natural demonstraram <0,001% de reactividade cruzada quando medida à sensibilidade do ensaio (4,4 mU/mL).

Substâncias	% Reactividade Cruzada
Albumina humana	<0,001
Factor de estimulação de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)	<0,001
Interleucina-3	<0,001
Alfa-1 antitripsina	<0,001
Gonadotropina coriônica humana	<0,001
Alfa-1 glicoproteína ácida	<0,001
IgG humano	<0,001
IgM humano	<0,001

A sequência genética da eritropoietina foi comparada com todas as sequências genéticas humanas presentes nas bases de dados Genbank e EMBL. A pesquisa não encontrou quaisquer genes significativamente semelhantes à sequência genética da eritropoietina.

14.5 Interferência

Foram avaliados estudos de acordo com os métodos da CLSI para determinar a interferência da hemoglobina, dos triglicéridos e da bilirrubina. Esses estudos indicam a ausência de qualquer interferência.

14.6 Tipo de Amostra

As amostras de Plasma EDTA combinado e de Soro apresentam um grau elevado de correlação.

Y (SORO) = 0,9 + 0,993 (PLASMA); r = 0,93 (intervalo: 4,7 - 42,5 mU/mL; soro).

CONSULTE A ÚTIMA PÁGINA PARA OBTER REFERÊNCIAS

SOUPRAVA EPO-Trac ¹²⁵I RIA

1. POUŽITÍ

URČENO PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ *IN VITRO*.

Souprava EPO-TracTM RIA je určena pro kvantitativní stanovení erytropoetinu (EPO) v séru nebo v plazmě s EDTA pomocí radioimunoanalýzy (RIA) jako pomocný prostředek při diagnóze anémií a polycytemií.

2. SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Erytropoetin (EPO) je glykoproteinový hormon (34 000 daltonů), který stimuluje dozrávání prekursorů červených krvinek. EPO je vyměšován ledvinami v závislosti na obsahu kyslíku v krvi. Normálně při poklesu hladiny kyslíku, jako v případě fyziologické hypoxie, hladina EPO v oběhovém systému stoupá a stimuluje zvýšenou produkci červených krvinek.¹

Abnormální hladiny EPO v krevním oběhu jsou charakteristické pro určité patologické poruchy, včetně různých anémií, polycytemií a nádorů. Byla zjištěna souvislost mezi nadměrnou tvorbou EPO a karcinomem ledvin. Byla nalezena souvislost mezi některými nádory jater a dalších orgánů a ektopickou produkcí erytropoetinu.²

Anémie je charakterizována nedostatečnou hladinou červených krvinek.² Anemičtí pacienti vykazující zvýšené hladiny EPO zahrnují pacienty s aplastickou anémií, anémií při deficitu železa a hemolytickou anémií. Anémie spojená s chronickým selháním ledvin je výsledkem nedostatečné produkce EPO ledvinami.

Zvýšená tvorba červených krvinek se nazývá polycytemie. U neléčené polycythaemia rubra vera dochází k nadměrné tvorbě červených krvinek hemopoetickými progenitory za přítomnosti nízkých nebo nedetekovatelných koncentrací EPO.³

Sekundární (stresová) polycytemie je způsobena zvýšenou produkcí a uvolňováním EPO, což vede ke zvýšení masы erytrocytů. Sekundární polycytemie může být způsobena různými faktory, jako jsou kouření, ledvinové kameny, plicní fibróza, nemoci srdce, nádory nebo defektní hemoglobin.²

Pro měření erytropoetinu u lidí a zvířat bylo vyvinuto několik metod. V počátcích vývoje tohoto stanovení zahrnovala metodika biologickou zkoušku *in vivo* za použití exhypoxických polycytemických živých myší.^{4,5} Spolu s vývojem rekombinantního lidského erytropoetinu byla také vyvinuta stanovení *in vitro*, která byla méně časově náročná a byla levnější. Tato stanovení *in vitro* zahrnují radioimunoanalýzu (RIA) a enzymovou imunoanalýzu (EIA).

3. PRINCIP STANOVENÍ

Stanovení EPO-Trac ¹²⁵I RIA společnosti DiaSorin je radioimunoanalýza v nerovnovázném stavu s kompetitivní vazbou využívající rekombinantní lidský erytropoetin pro značenou sloučeninu i kalibrační roztoky. Vzorky jsou inkubovány s primární kozí protilátkou EPO-Trac (kozí protilátka proti EPO) a ponechány reagovat 2 hodiny, pak je přidána značená sloučenina EPO-Trac značená jódem 125. Po inkubaci přes noc je do určitých zkumavek přidána sekundární protilátka, oslí anti-kozí precipitační komplex (DAG-PPT) (TABULKA I). DAG-PPT je oslí antisérum proti kozí protilátce, které je předem vysráženo s normálním kozím sérem a povrchově aktivní látkou. DAG-PPT je inkubováno s kalibračními roztoky nebo vzorky, primární protilátkou a značenou sloučeninou po dobu třiceti minut, pak jsou zkumavky odstředěny, aby se oddělila navázaná značená sloučenina od nenavázané značené sloučeniny. Nenavázaná značená sloučenina je odstraněna dekantací supernatantu z každé zkumavky. Radioaktivita navázané značené sloučeniny ve zbylých peletách komplexu DAG-PPT je změřena v čítači záření gama po dobu 1 minuty. Počet impulzů ¹²⁵I je nepřímo úměrný množství EPO přítomnému v každém vzorku.

4. ČINIDLA DODANÁ V SOUPRAVĚ

Primární protilátka EPO-Trac (MODRÁ)	1 lahvička, 11 ml
Kalibrační roztoky EPO-Trac (0 - 5)	1 lahvička 11 ml, 5 lahviček po 2,1 ml
EPO-Trac DAG-ppt	2 lahvičky po 35 ml
Značená sloučenina EPO-Trac (ČERVENÁ)	1 lahvička, 11 ml
Kontrolní vzorky EPO-Trac	2 lahvičky po 2,1 ml
Počet testů	100

UCHOVÁVÁNÍ: Po přijetí je nutné soupravu uchovávat při teplotě 2 - 8 °C. Po otevření uchovávejte každé činidlo při teplotě 2 – 8 °C do uplynutí data expirace vyznačeného na štítku. Činidla nelze použít po uplynutí data expirace. Datum expirace soupravy je uvedeno na vnějším štítku a odpovídá datu expirace značené sloučeniny.

Činidla z různých šarží se nesmí navzájem kombinovat.

4.1 Kalibrační roztoky EPO-Trac, 0 – 5: činidlo připravené k přímému použití

Šest kalibračních roztoků rekombinantního erythropoetinu v nominálních koncentracích od přibližně 0 do 280 mU/ml je předředěno pufovaným fyziologickým roztokem obsahujícím stabilizátory proteinů, antimikrobiální látky a 0,1 % azidu sodného. Referenčními standardy pro kalibrační roztoky soupravy jsou World Health Organization (WHO) 2nd IRP Erythropoietin, HUM, stanovení v moči/biologické stanovení 67/343⁶ a mezinárodní kalibrační roztok pro erythropoetin WHO (IS), od rekombinantní DNA (rDNA) odvozený kód č. 87/684. Kalibrační roztoky soupravy vykazují zaměnitelnost se vzorky pacientů, pokud jsou používány s činidly a pracovními postupy tohoto diagnostického testu in vitro dle uvedených doporučení.

4.2 ¹²⁵I EPO-Trac: činidlo připravené k přímému použití

Lidský rekombinantní erythropoetin je značený jodem 125, 2 µCi (74 kBq) a naředěný pufovaným fyziologickým roztokem obsahujícím stabilizátory proteinů, antimikrobiální látky, 0,1 % azidu sodného a červené barvivo pro potraviny, léčiva a kosmetiku č. 40 (FD & C, Food, Drug and Cosmetic).

4.3 Primární protilátka EPO-Trac: činidlo připravené k přímému použití

Kozí sérum proti lidskému EPO je zředěné pufovaným fyziologickým roztokem obsahujícím stabilizátory proteinů, antimikrobiální látky, 0,1 % azidu sodného a modré barvivo pro potraviny, léčiva a kosmetiku č. 1 (FD & C).

4.4 Precipitační komplex EPO-Trac, DAG-PPT: lyofilizované činidlo

Oslí antisérum proti kozí protilátce je předsráženo s normálním kozím sérem a povrchově aktivní látkou, rozpuštěno v BSA-boritanovém pufru obsahujícím antimikrobiální látky a 0,03 % thimerosalu a je lyofilizováno. Obsah lahvičky rekonstituujte 35 ml přečištěné vody, důkladně promíchejte, až se suspenze viditelně zhomogenizuje, a potom nechejte stát nejméně 30 minut při pokojové teplotě za občasných promíchání. Během dávkování DAG-PPT do zkumavek suspenzi míchejte krouživým pohybem lahvičky nebo malým magnetickým míchadlem při velmi nízkých otáčkách. Jeví-li činidlo před použitím známky rehydratace, nepoužívejte ho.

4.5 Kontrolní vzorky EPO-Trac, hladiny 1 a 2: činidlo připravené k přímému použití

Do pufovaného fyziologického roztoku obsahujícího stabilizátor proteinů je přidán lidský rekombinantní EPO tak, aby byla získána koncentrace ve specifikovaném rozmezí uvedeném v svědčení o analýze. Je přidáno 0,1% azidu sodného a další stabilizátory.

5. VAROVÁNÍ A ZVLÁŠTNÍ OPATŘENÍ

URČENO PRO DIAGNOSTICKÉ POUŽITÍ *IN VITRO*.

Není určeno pro vnitřní ani vnější použití u lidí ani zvířat.

ČINIDLA OBSAHUJÍ AZID SODNÝ.

UPOZORNĚNÍ: Některá činidla v této soupravě obsahují azid sodný. Azid sodný může reagovat s olovem nebo mědí v potrubí a vytvářet vysoce výbušné azidy kovů. Při likvidaci spláchněte velkým množstvím vody, zabráníte tak usazování azidu. Další informace naleznete v dokumentu „Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts“ v příručce Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 vydané Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 1976.

Věty popisující charakter nebezpečnosti chemických látek Evropského společenství (R věty) (směrnice Rady 1999/45/ES)

R20/21/22 - Zdraví škodlivý při vdechování, styku s kůží a při požití.

R32 - Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami.

S28 - Při styku s kůží okamžitě omyjte velkým množstvím vody.

ČINIDLA OBSAHUJÍCÍ THIMEROSAL

Některá činidla v této soupravě obsahují thimerosal, který obsahuje sloučeninu rtuti. Při likvidaci kovové rtuti, anorganických sloučenin rtuti, oxidů rtuti a dalších sloučenin rtuti musejí být přísně dodržovány všechny místní a státní předpisy.

VAROVÁNÍ: Tento výrobek obsahuje chemickou látku, o níž je státu Kalifornie známo, že způsobuje vrozené vady nebo další reprodukční poškození.

ČINIDLA OBSAHUJÍCÍ JÓD 125

Tato souprava obsahuje radioaktivní materiál, jehož množství nepřevyšuje 2 μCi (74 kBq) jódu 125. Při skladování, manipulaci a likvidaci materiálu je nutné dodržovat odpovídající bezpečnostní opatření a správnou laboratorní praxi.

Pro lékaře a instituce přijímající radioizotopy v rámci obecné licence:

Tento radioaktivní materiál mohou obdržet, nabývat, vlastnit a používat pouze lékaři, veterináři, kteří vykonávají veterinární praxi, klinické laboratoře nebo nemocnice, a to pouze pro účely klinických nebo laboratorních testů in vitro, při nichž není materiál ani záření, jež z něj vychází, aplikováno vnitřně ani vnějšně lidem ani zvířatům. Jeho obdržení, nabytí, držení, užívání a přeprava podléhá předpisům a obecné licenci Komise pro dohled nad jadernou bezpečností USA (U.S. Nuclear Regulatory Commission) nebo státu, s nímž komise uzavřela dohodu o výkonu regulační pravomoci.

1. Skladování radioaktivního materiálu musí být omezeno pouze na určený prostor.
2. Přístup k radioaktivnímu materiálu musí být omezen pouze na pracovníky s příslušným oprávněním.
3. Radioaktivní materiál nepipetujte ústy.
4. Při práci v prostorech určených k práci s radioaktivním materiálem nejezte ani nepijte.
5. V případě rozlití je nutno materiál setřít, potom omýt alkalickým detergentem nebo roztokem pro radiologickou dekontaminaci. Veškeré použité sklo se musí před mytím s jiným laboratorním sklem důkladně umýt vodou.

Pro lékaře a instituce přijímající radioizotopy v rámci konkrétní licence:

Přijetí, použití, transport a likvidace radioaktivních materiálů podléhá předpisům a podmínkám konkrétní licence.

VAROVÁNÍ: Tento výrobek obsahuje chemickou látku, o níž je státu Kalifornie známo, že způsobuje rakovinu.

POZOR: Hodnoty radioaktivity uvedené na příbalové informaci se mohou mírně lišit od hodnot uvedených na štítku vnějšího obalu a na štítku lahvičky se značenou látkou. Štítek vnějšího obalu a lahvičky se značenou látkou označuje množství radioaktivity k datu kalibrace; příbalová informace označuje teoretickou radioaktivitu soupravy.

DALŠÍ VAROVÁNÍ

1. Zabraňte rozstříknutí nebo vytvoření aerosolu.
2. Inkubační doby nebo teploty jiné než zde uvedené mohou vést k chybným výsledkům.
3. Mikrobiální kontaminace činidel může vést k chybným výsledkům.
4. Nenahrazujte činidla jinými šaržemi činidel ani činidly jiných výrobců.

6. POŽADAVKY NA VZORKY

UPOZORNĚNÍ: Se vzorky pacientů a všemi materiály, které s nimi přijdou do styku, zacházejte jako s materiály schopnými přenášet infekce a při jejich likvidaci dodržujte náležitá bezpečnostní opatření.

ODBĚR A UCHOVÁVÁNÍ SÉRA NEBO PLAZMY

Odběr dostatečného množství vzorku krve se musí provést aseptickou venepunkcí do 5 ml nebo 10 ml evakuované sterilní skleněné zkumavky, aby se získalo minimálně 400 µl séra nebo plazmy s EDTA na každé stanovení (pro 2 paralely). Je třeba věnovat pozornost rychlému oddělení séra od sraženiny centrifugací, aby nedošlo k hemolýze. Sérum nebo plazmu centrifugujte při pokojové teplotě po dobu 10 minut při 760 g*. Jako antikoagulans pro plazmu použijte EDTA (72 mg/5 ml krve). Pro zachování integrity vzorku není nutné přidání dalších konzervačních látek ani přísad.

Sérum nebo plazmu s EDTA je nutné převést do zakrytých sterilních zkumavek pro uložení. Sérum je stabilní až 7 dní při teplotě 4 °C. Pro dlouhodobější uložení ho zmrazte na -20 °C v mrazničce bez automatického odstraňování námrazy. Zkoušky provedené společností DiaSorin prokázaly, že vzorky séra zmrazené při stálé teplotě -20 °C byly stabilní až 18 měsíců. Vzorky séra se nesmí opakovaně zmrazovat a rozmrazovat. Veškeré plasty, sklo a další materiál, které přicházejí do styku se vzorkem, musejí být prosté jakékoli kontaminace.

Aby se vyloučilo nepředvídatelné rušení látkami rozpustnými v tucích, doporučuje se používat vzorky odebrané nalačno, není to však nutné. Viditelně hemolyzované vzorky zlikvidujte. Bilirubin (< 5 mg/dl) neruší toto stanovení. Nebyl hodnocen rušivý vliv žádných léků.

7. POTŘEBNÝ MATERIÁL A VYBAVENÍ, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ

DODÁVKY

- 7.1 Pryžové nebo latexové rukavice, které je třeba nosit během provádění testu.
- 7.2 Jednorázové zkumavky z borokřemičitého skla, 12 x 75 mm.
- 7.3 Centrifuga s regulovanou teplotou (20 – 25 °C), která pojme zkumavky o rozměrech 12 x 75 mm, odstředované při 1600 ±20 g*.
- 7.4 Scintilační čítač záření gama, který je kalibrován a schopný počítat jód -125.
- 7.5 Míchačka „vortex“.
- 7.6 Pipetovací zařízení:
 - a. mikropipetory kalibrované na dávkování 200 (±4) µl,
 - b. opakovací dávkovače kalibrované na dávkování 100 (±2) µl a 500 (±5) µl.
- 7.7 Přечиštěná voda na ředění DAG-PPT.
- 7.8 Minutka pro měření času s přesností ±2 minut.
- 7.9 Semilogaritmický papír se třemi řády.

8. POSTUP STANOVENÍ

- 8.1 Připravte neznámé vzorky.
- 8.2 Vytvořte sadu párů označených zkumavek na jedno použití 12 x 75 mm pro paralely podle schématu stanovení uvedeného na zadní straně.
- 8.3 Přidejte činidla v následujícím pořadí:
 - a. **Zkumavky pro stanovení celkového počtu impulzů**
Odložte stranou až do kroku 6 (slouží pro výpočty v rámci řízení jakosti – viz část Řízení jakosti)
 - b. **Zkumavky pro nespecifickou vazbu (NSB)**
200 µl kalibračního roztoku 0 na zkumavku
 - c. **Kalibrační roztok 0**
200 µl kalibračního roztoku 0 na zkumavku

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{poloměr v cm}) (\text{ot./minutu})^2$$

d. Kalibrační roztoky EPO-Trac (1 - 5)

200 µl kalibračního roztoku na zkumavku

e. Kontrolní vzorky a neznámé vzorky

200 µl každého vzorku nebo kontrolního vzorku na zkumavku

- 8.4** Přidejte 100 µl (modré) primární kozí protilátky proti EPO do všech zkumavek kromě zkumavek na celkový počet impulzů a NSB.
- 8.5** Zkumavky jemně promíchejte na třepačce vortex a inkubujte 2 hodiny (± 10 minut) při pokojové teplotě 20 - 25 °C.
- 8.6** Do všech zkumavek přidejte 100 µl (červeného) značeného EPO.
- 8.7** Jemně promíchejte zkumavky na vortexu a inkubujte je po dobu 16 - 24 hodin při 2 - 8 °C.
- 8.8** Před dávkováním intenzivně promíchejte DAG-PPT. Během dávkování 500 µl DAG-PPT do všech zkumavek kromě zkumavek na celkový počet impulzů suspenzi míchejte krouživým pohybem lahvičky nebo malým magnetickým míchadlem při velmi nízkých otáčkách.
- 8.9** Zkumavky promíchejte na třepačce vortex a inkubujte 30 (± 5) minut při pokojové teplotě (20 - 25 °C).
- 8.10** Zkumavky centrifugujte při 1600 x g* po dobu 20 minut při teplotě 20 - 25 °C.
- 8.11** Odložte stranou zkumavky pro stanovení celkového počtu impulzů, pak dekantujte supernatant ze zbývajících zkumavek do příslušné nádoby na radioaktivní odpad. Dříve než zkumavky otočíte do vzpřímené polohy, odsajte veškeré kapky supernatantu, jež by mohly zůstat na jejich okrajích, překlopením zkumavek dnem vzhůru na savý papír.
- 8.12** Pomocí scintilačního čítače záření gama spočítejte impulzy precipitátu každé zkumavky a zkumavek pro stanovení celkového počtu impulzů po dobu 1 minuty.

9. POZNÁMKY K POSTUPU

- 9.1** Přidáváním každého alikvotního dílu činidla do dolní třetiny zkumavky zajistíte dokonalé promíchání činidel.
- 9.2** Pokud nelze zkumavky dekantovat do 5 minut po dokončení centrifugace, je nutné před slitím supernatantu zkumavky znovu centrifugovat.
- 9.3** Aby bylo zajištěno úplné monitorování soustavné kvality průběhu RIA, je možné kontrolovat další faktory. Společnost DiaSorin doporučuje pro zajištění soustavně shodné funkční charakteristiky soupravy pravidelné kontroly dále uvedených parametrů.

a. Celkový počet impulzů

b. Maximální vazba

Průměrný počet impulzů za minutu (CPM) zkumavek s nulovým kalibračním roztokem/průměrná hodnota CPM zkumavek pro stanovení celkového počtu impulzů.

c. Nеспецифická vazba

Průměrný počet impulzů za minutu (CPM) zkumavek NSB/průměrná hodnota CPM zkumavek na celkový počet impulzů.

d. Směrnice kalibrační křivky

Monitorujte například body potlačení o 80 %, 50 % a 20 % na kalibrační křivce.

* g = (1118×10^{-8}) (poloměr v cm) (ot./minutu)²

10. ŘÍZENÍ JAKOSTI

Každá laboratoř musí do každého stanovení zařadit nejméně dva kontrolní vzorky, aby bylo zajištěno sledování funkční charakteristiky stanovení. Lze použít komerčně dostupné kontrolní vzorky nebo dva referenční kontrolní vzorky dodané se soupravou. Kontrolní vzorky dodané se soupravou obsahují EPO ve dvou koncentracích. Kontrolní vzorky stanovila společnost DiaSorin pomocí soupravy DiaSorin EPO-Trac^{125I} RIA. Rozmezí koncentrací každého kontrolního vzorku je uvedeno na osvědčení o analýze a představuje limity stanovené společností DiaSorin pro hodnoty kontrolních vzorků, které lze získat pomocí spolehlivých stanovení. Pro sledování funkční charakteristiky kontrolních vzorků se musí uchovávat grafy řízení jakosti. Přípustné meze funkční charakteristiky je nutné stanovit v každé individuální laboratoři pro každou hladinu kontrolního vzorku pomocí statistických metod určených k detekci systematických i náhodných chyb. Před hlášením výsledků testů pacientů musí kontrolní výsledky splňovat kritéria přijatelnosti v dané laboratoři.^{19,20,21}

11. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Existuje mnoho metod výpočtu výsledků testů RIA. Všechny jsou založeny na získání kalibrační křivky vnesením míry vazby proti deklarovaným koncentracím kalibračních roztoků. Tento graf může být v lineárních nebo logaritmických souřadnicích. Každá z těchto metod poskytuje v zásadě stejné hodnoty kontrolních vzorků a vzorků, ačkoli některá stanovení se mohou lépe „hodit“ pro jednu metodu, a jiná pro jinou. Metoda výpočtu laboratoře řízení jakosti společnosti DiaSorin je závislost % B/B₀ [množství značené sloučeniny vázané vzorkem (B) děleno množstvím značené sloučeniny vázané kalibračním roztokem pro nulu (B₀) x 100] (viz krok 3 níže) na logaritmu koncentrace.

- 11.1 Vypočítejte průměrnou hodnotu (CPM) pro každý kalibrační roztok, kontrolní vzorek a neznámý vzorek.
- 11.2 Od všech počtů impulsů odečtěte průměrnou hodnotu CPM zkumavek pro nespécifickou vazbu (NSB).
- 11.3 Vydělte korigovaný CPM každého kalibračního roztoku, kontrolního vzorku nebo vzorku pacienta korigovaným CPM kalibračního roztoku 0.

$$\% B/B_0 = \frac{\text{CPM kalibračního roztoku nebo neznámého vzorku} - \text{CPM zkumavky NSB}}{\text{CPM kalibračního roztoku 0} - \text{CPM zkumavky NSB}} \times 100$$

- 11.4 Pomocí semilogaritmického papíru se třemi cykly vynesete procento B/B₀ pro kalibrační roztoky EPO-Trac (svislá osa) proti koncentraci vytištěné na listu specifikací pro kontrolu kvality (vodorovná osa).
- 11.5 Těmito body proložte optimální přímkou (obr. 1).
- 11.6 Z tohoto grafu interpolujte koncentrace erythropoetinu v neznámých vzorcích.
- 11.7 Odečtete-li pro kterýkoli neznámý vzorek hodnotu nižší než <4,4 mU/ml, mez detekce tohoto testu, nahláste hodnotu jako <4,4 mU/ml.
- 11.8 Pokud je odečet některého vzorku vyšší než nejvyšší kalibrační roztok, musí se vzorek zředit kalibračním roztokem 0 ze soupravy EPO-Trac, kat. č. 23211 a analyzovat znovu. Pro většinu vzorků bude stačit ředění 1:2 a 1:5.

12. OMEZENÍ POSTUPU

- 12.1 Výsledky tohoto stanovení by měly být použity spolu s informacemi z klinických nálezů a dalších diagnostických postupů.
- 12.2 Nebyl testován rušivý vliv žádných léků na toto stanovení.

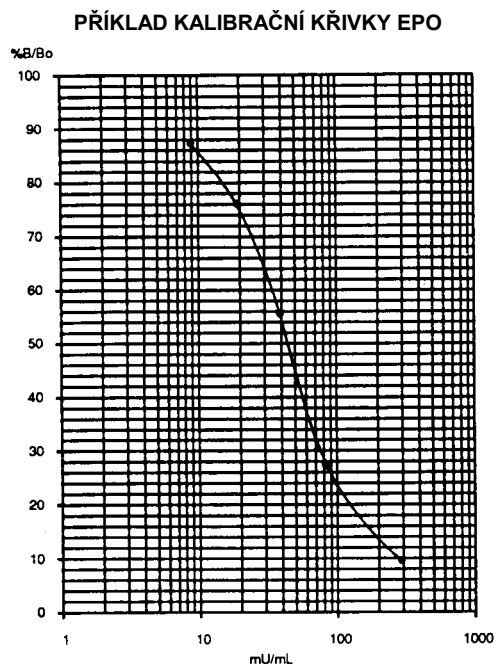
TABULKA II
Vzorová data stanovení EPO-Trac™ RIA společnosti DiaSorin

Zkumavka	Počet impulzů za minutu - CPM (mU/ml)	Průměrný CPM	Průměr (CPM-NSB) (B)	Navázané procento (B/T)**	Navázané procento (B/B ₀)	Konc. (mU/ml)	*Korig. konc.
Celkový počet impulzů	14 823						
(T)14 270	14 546						
NSB	492						
	447	470		3,2**			
Kalibrační roztok 0	4 783						
	4 904	4 844	4 374 (B ₀)	33**	100,0	0	
Kalibrační roztoky							
1	4 321						
	4 273	4 297	3 827		87,5	9,0	
2	3 832						
	3 773	3 803	3 333		76,2	19,0	
3	2 896						
	2 920	2 908	2 438		55,7	39,0	
4	1 645						
	1 669	1 657	1 187		27,1	83,0	
5	865						
	932	898	428		9,8	290,0	
Kontrolní vzorek, hladina 1	3 924						
	3 877	3 901	3 431		74,4	16,9	
Kontrolní vzorek, hladina 2	1 918						
	1 935	1 927	1 457		33,3	69,3	
Nezn. vz. č. 1	1 217						
	1 232	1 225	755		17,3	127	
1:2	1 832						
	1 873	1 853	1 383		31,6	72,6	124,8
Nezn. vz. č. 2	1 508						
	1 437	1 472	1 002		22,9	96,6	
1:2	2 264						
	2 309	2 286	1 816		41,5	56,0	91,6

Údaje typických vzorků a kalibrační křivka jsou uvedeny v TABULCE II a na obr. 1; tyto informace slouží pouze jako referenční údaj a nelze je použít pro výpočet žádného výsledku.

* Korig. konc. = korigovaná koncentrace; pouze pro ředěné vzorky.

** Tyto parametry jsou sledovány pro účely řízení jakosti (viz část Řízení jakosti).



OBRÁZEK 1

* Tento graf je vytvořen ze vzorových dat (TABULKA II) a je pouze orientační. Nepoužívejte tento graf pro výpočet hodnot vašeho stanovení.

13. PŘEDPOKLÁDANÉ HODNOTY

13.1 Normální rozmezí

KAŽDÁ LABORATOŘ SI MUSÍ STANOVIT SVÉ VLASTNÍ ROZMEZÍ NORMÁLNÍCH HODNOT.

Hodnoty erythropoetinu v séru byly měřeny u (104) normálních mužů a žen (45 M, 61 Ž) z Minneapolisu, stát Minnesota, USA pomocí soupravy EPO-Trac RIA. Byla zjištěna průměrná hodnota koncentrace EPO $17,7 \pm 7,5$ mU/ml. Jednotlivé hodnoty se pohybovaly od minima 4,9 do maxima 52,7 mU/ml. Průměrná hodnota koncentrace EPO v séru činila 18,3 mU/ml u normálních žen a 16,6 mU/ml u normálních mužů. Nebyl pozorován žádný statistický rozdíl ($p = 0,27$) mezi hladinami EPO u žen a u mužů.

V několika dalších studiích normální populace pomocí vlastní metodiky RIA EPO byly zjištěny průměrné hodnoty EPO podobné výše uvedené studií.^{2, 4, 5} Některé z těchto studií prokázaly významné, avšak malé rozdíly mezi ženami a muži, přičemž ženy vykazovaly o něco vyšší hodnoty než muži.^{8, 9} Výsledky těchto studií jsou shrnuty v následující tabulce.

Studie	Pohlaví	n=	Střední hodnota ± 1 S.D.
Koeffler 1981 ²	obě	26	$14,9 \pm 4,2$ mU/ml
Garcia 1982 ⁴	muži	364	$17,2 \pm 5,5$ mU/ml
	ženy	199	$18,8 \pm 6,2$ mU/ml
Ryner 1989 ⁵	muži	50	$8,0 \pm 3,2$ mU/ml
	ženy	50	$11,3 \pm 3,4$ mU/ml

13.2 Patologické hodnoty

Abnormální koncentrace EPO v krevním oběhu, pokud jsou vyšetřovány spolu s dalšími klinickými informacemi, mohou být charakteristické pro určitá onemocnění.

Pacienti s polycythaemia rubra vera typicky vykazují normální nebo nízké hladiny EPO, pokud je tato hladina hodnocena vlastními metodikami RIA.^{8,9} Pacienti se sekundární polycytemií způsobenou hypoxií, jako je tomu při městnavé srdeční vadě nebo chronické obstrukční plicní chorobě, vykazují zvýšené hladiny EPO.^{3,8,9} Ektopická produkce EPO může někdy vést ke zvýšeným hladinám EPO v séru a následně sekundární polycytemii u pacientů s myomem dělohy, hemangioblastomem mozečku, karcinomem jater a feochromocytomem. Nádory ledvin, jako jsou hypernefrom, adenom a sarkom, mohou vést k podobné erytrocytóze související s EPO.²

Většina anemických pacientů má zvýšené hladiny EPO v séru, i když míra zvýšení závisí na stupni a typu anémie. Zvýšení hladiny EPO v séru může být zjištěno u pacientů se srpkovitou anémií nebo HIV pozitivních, hladiny EPO jsou však v průměru méně výrazné než u jiných anémií.^{10,11}

Anémie zjištěné u pacientů s poruchami ledvin jsou považovány za důsledek deficitní produkce erythropoetinu způsobené onemocněním nebo chyběním ledvin. Anemičtí pacienti bez ledvin závislí na dialýze mají nízké nebo nedetekovatelné hladiny EPO.¹² Na druhé straně pacienti závislí na dialýze s finálním stadiem nemoci ledvin mají obvykle normální nebo vyšší hladiny EPO v séru. Hladiny EPO v séru, zjištěné u těchto pacientů, jsou však pokládány za nepřiměřeně nízké pro tento stupeň anémie.^{12,13} Pacienti s recentním transplantátem ledvin mají někdy zvýšené hladiny EPO v séru jako reakci na anémii.¹⁴

V klinické studii provedené v Minneapolis, stát Minnesota, USA, byly hladiny EPO měřeny pomocí soupravy EPO-Trac RIA u (28) pacientů na dialýze s chronickým selháním ledvin. Průměrné hladiny EPO v séru činily $38,4 \pm 67,1$ mU/ml (rozmezí: 10,4 - 360,6 mU/ml), zatímco hladiny hemoglobinu dosahovaly průměrně $9,4 \pm 1,6$ g/dl (rozmezí: 6,9 až 12,3 g/dl). Tato hodnota byla považována za nepřijatelně nízkou pro skupinu pacientů s podobným stupněm anémie, avšak s normální funkcí ledvin.^{12,15} Tato studie potvrdila dřívější nálezy relativního deficitu erythropoetinu u pacientů závislých na dialýze.^{15,16} Kromě toho byly hladiny erythropoetinu stanoveny u řady skupin pacientů. Následující tabulka uvádí průměrné naměřené hladiny EPO. Pacientské kontrolní vzorky byly náhodně vybrány z hodnocené populace pacientů.

**Souhrnná tabulka průměrných hladin EPO u různých skupin pacientů,
změřených pomocí soupravy EPO-Trac RIA**

Diagnóza	n	Střední hodnota EPO (mU/ml)	S.D.
Normální hodnoty	36	15,7	10,5
Kontrolní vzorky pacientů	18	18,6	11,3
Pacienti na dialýze	28	38,4	67,1
Myelodysplazie	2	651,0	887,2
Myelofibróza	2	116,0	147,5
Erytroidní hypoplazie/aplazie	4	1 545	1 213
Nehodgkinský lymfom	15	26,4	13,8
Hodgkinova choroba	3	29,8	31,3
Chronická lymfocytická leukémie	3	17,4	9,7
Makroglobulinémie	2	30,2	15,1
Myelom	3	49,7	52,3
Hemolytická anémie	3	51,4	29,2
Různé anémie	10	32,2	18,9
Pacienti s erytrocytózou	6	14,6	8,5
Pacienti s polycythaemia vera	6	20,7	4,9

Výše uvedené hladiny erythropoetinu mohou, nebo nemusí odpovídat uvedeným onemocněním. Všichni pacienti byli v různých stádiích léčby, která může ovlivnit hladinu EPO očekávanou při jejich konkrétním zdravotním stavu. Při interpretaci konkrétních hladin erythropoetinu musí být brán ohled na zdravotní stav jednotlivého pacienta a stav jeho erythropoetického systému.

14. ÚDAJE O FUNKČNÍ CHARAKTERISTICE

14.1 Reprodukovatelnost

Odchylka v rámci stanovení Sérum (hodnoty = mU/ml)

	Střední hodnota	S.D.	% C.V.**	N
NÍZKÁ	11,1	1,3	11,9	20
NÍZKÁ	12,4	1,2	10,0	20
NÍZKÁ	22,9	1,2	5,2	10
STŘEDNÍ	39,9	1,9	4,8	10
VYSOKÁ	106,5	5,1	4,8	10
VYSOKÁ	254,6	29,8	11,7	20

Odchylka mezi stanoveními Sérum (hodnoty = mU/ml)

	Střední hodnota	S.D.	% C.V.**	N
NÍZKÁ	9,8	1,4	14,3	5
NÍZKÁ	13,2	1,6	12,1	5
NÍZKÁ	19,0	1,3*	6,7	5
STŘEDNÍ	40,9	1,4	3,5	5
VYSOKÁ	147,6	15,7	10,6	5
VYSOKÁ	220,2	26,9	12,2	5

* Stanovení vzorků proběhlo v pěti samostatných stanoveních (n = 5)

** % CV. = (S.D. ÷ střední hodnota) 100

14.2 PRAVDIVOST: PRAVDIVOST STANOVENÍ BYLA KONTROLOVÁNA TESTEM LINEARITY A TESTEM VÝTĚŽNOSTI

Paralelnost ředění

Studie řady ředění neznámých vzorků séra

Vzorek	Ředění	Střední hodnota EPO (mU/ml)	% Střední hodnoty/ střední hodnota ředění 0
1	0	15,6*	—
	1:2	17,4	111,5
2	0	127,1	—
	1:2	124,8	98,2
	1:4	141,2	111,1
	1:8	152,0	119,6
3	0	96,6	—
	1:2	91,6	94,8
	1:4	100,4	103,9
	1:8	100,0	103,5
4	0	51,3	—
	1:2	52,8	102,9
	1:4	38,4	74,9

* Hodnoty nulového ředění byly hodnoty změřené před naředěním roztokem pro ředění séra společnosti DiaSorin.

Správnost

Studie výtěžnosti

Sérum (hodnoty = mU/ml)

Sada č.	Pozadí*	Přidaný kalibrační roztok EPO	Naměřená hodnota**	Procento výtěžnosti***
1	8,9	19,5	27,3	94,4
	8,9	41,5	51,9	103,6
	8,9	145,0	182,0	119,4
2	18,1	19,5	37,3	98,5
	18,1	41,5	66,0	115,4
	18,1	145,0	205,6	129,3
3	44,3	19,5	62,9	95,4
	44,3	41,5	87,6	104,3
	44,3	145,0	158,5	78,8
4	80,8	19,5	101,3	105,1
	80,8	41,5	127,1	111,6
	80,8	145,0	210,7	89,6
				Stř. hodnota = 103,8

* Hodnota stanoveného vzorku dělená 2.

** Spojené stejné objemy kalibračních roztoků EPO-Trac 3, 4 a 5 a vzorku odebraného pacientům.

*** % výtěžnosti = [(měřená hodnota - pozadí)/přidaný EPO] x 100

14.3 Analytická citlivost (meze detekce)

Nejmenší detekovatelná koncentrace EPO je 4,4 mU/ml, když je definována jako patrná koncentrace při 3 odchylky kalibračního roztoku od počtu impulzů při maximálním nebo nulovém navázání. Neznámé vzorky, jejichž odečet naměřené hodnoty je nižší než citlivost tohoto stanovení, je nutné hlásit jako <4,4 mU/ml.

14.4 Analytická specifčnost

Výsledky pokusu se zkříženou reaktivitou pomocí systému RIA EPO-Trac a 8 přirozeně se vyskytujících sérových proteinů prokázaly zkříženou reaktivitu <0,001%, když bylo měření prováděno při hodnotě citlivosti stanovení (4,4 mU/ml).

Látky	Zkřížená reaktivita (%)
Lidský albumin	<0,001
Granulocytární makrofágový kolonie stimulující faktor (GM-CSF)	<0,001
Interleukin-3	<0,001
Alfa-1-antitrypsin	<0,001
Lidský chorionický gonadotropin	<0,001
Alfa-1 kyselý glykoprotein	<0,001
Lidský IgG	<0,001
Lidský IgM	<0,001

Sekvence genu pro erythropoetin byla porovnána se všemi sekvencemi lidských genů v databázích Genbank a EMBL. Vyhledávání nenalezlo žádné geny, které by byly významně podobné sekvenci genu pro erythropoetin.

14.5 Rušení

Studie byly hodnoceny podle metodiky CLSI, aby bylo zjištěno rušení hemoglobinem, triglyceridy a bilirubinem. Tyto studie ukazují, že nebylo zjištěno žádné rušení.

14.6 Druh vzorku

Byla prokázána vysoká korelace v párech vzorků plazmy s EDTA a vzorků séra.
Y (SÉRUM) = 0,9 + 0,993 (PLAZMA); r = 0,93 (rozmezí: 4,7 - 42,5 mU/ml; sérum).

SEZNAM LITERATURY VIZ POSLEDNÍ STRANA

1. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ *IN VITRO*.

Το kit RIA EPO-Trac™ προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ερυθροποιητίνης (EPO) σε ορό ή πλάσμα EDTA με ραδιοανοσοπροσδιορισμό (RIA) ως βοήθημα στη διάγνωση των αναιμιών και των πολυκυτταραιμιών.

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η ερυθροποιητίνη (EPO) είναι μια γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη (34.000 Dalton) που διεγείρει την ωρίμανση των πρόδρομων των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η EPO εκκρίνεται από το νεφρό σε ανταπόκριση της συγκέντρωσης οξυγόνου στο αίμα. Συνήθως, όταν τα επίπεδα οξυγόνου μειώνονται, όπως στη φυσιολογική υποξία, το επίπεδο της EPO στο κυκλοφορικό σύστημα αυξάνεται και διεγείρει την αυξημένη παραγωγή ερυθρών κυττάρων.¹

Τα παθολογικά επίπεδα EPO στο αίμα του κυκλοφορικού συστήματος είναι χαρακτηριστικά ορισμένων παθολογικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένων διάφορων αναιμιών, πολυκυτταραιμιών και νεοπλασμάτων. Η υπερπαραγωγή EPO έχει συσχετιστεί με νεφρικό καρκίνωμα. Μερικά νεοπλάσματα ήπατος και άλλα νεοπλάσματα οργάνων έχουν συσχετιστεί με την εκτοπική παραγωγή ερυθροποιητίνης.²

Η αναιμία χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή επίπεδα ερυθρών αιμοσφαιρίων.² Οι αναιμίες ασθενών με αυξημένα επίπεδα EPO περιλαμβάνουν απλαστική αναιμία, αναιμία ανεπάρκειας σιδήρου και αιμολυτική αναιμία. Η αναιμία που σχετίζεται με τη χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι αποτέλεσμα ανεπαρκούς παραγωγής EPO από τα νεφρά.

Η υπερπαραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων καλείται πολυκυτταραιμία. Σε αληθή πολυκυτταραιμία που δεν έχει αντιμετωπιστεί, παρουσιάζεται υπερπαραγωγή των ερυθρών αιμοσφαιρίων από αιματοποιητικούς προγόνους παρουσία χαμηλών ή μη ανιχνεύσιμων συγκεντρώσεων EPO.³

Η δευτερογενής (άγχος) πολυκυτταραιμία προκαλείται από αυξημένη παραγωγή και έκλυση EPO έχοντας ως αποτέλεσμα αυξημένη μάζα ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η δευτερογενής πολυκυτταραιμία ενδεχομένως να προκαλείται από διάφορους παράγοντες όπως κάπνισμα, πέτρες στα νεφρά, πνευμονική ίνωση, καρδιακά νοσήματα, νεοπλάσματα ή έλλειψη αιμοσφαιρίνης.²

Έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για τη μέτρηση της ερυθροποιητίνης σε ανθρώπους και ζώα. Η αρχική ανάπτυξη προσδιορισμών περιλάμβανε βιολογικό προσδιορισμό *in vivo* με χρήση εξυποζικών πολυκυτταραιμικών ζωντανών ποντικών.^{4,5} Με την ανάπτυξη της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης ερυθροποιητίνης, αναπτύχθηκαν επίσης προσδιορισμοί *in vitro* οι οποίοι είναι λιγότερο χρονοβόροι και ακριβοί. Αυτοί οι προσδιορισμοί *in vitro* περιλαμβάνουν ραδιοανοσοπροσδιορισμούς (RIA) και ενζυμικούς ανοσοπροσδιορισμούς (EIA).

3. ΑΡΧΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η διαδικασία του RIA ¹²⁵I EPO-Trac της DiaSorin είναι ραδιοανοσοπροσδιορισμός ανταγωνιστικής δέσμησης και ασταθούς ισορροπίας ο οποίος χρησιμοποιεί ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη τόσο για τον ιχνηθέτη όσο και για τους βαθμονομητές. Τα δείγματα επωάζονται με το πρωτογενές αντίσωμα αίγας EPO-Trac (αντι-EPO αίγας) και αφήνονται να αντιδράσουν για 2 ώρες πριν την προσθήκη του ιχνηθέτη EPO-Trac ο οποίος είναι σημασμένος με ιώδιο 125. Μετά από ολονύκτια επώαση, το δευτερογενές αντίσωμα συμπλόκου κατακρήμνισης αντι-αίγας από όνο (DAG-PPT) προστίθεται στους ειδικούς δοκιμαστικούς σωλήνες του προσδιορισμού (ΠΙΝΑΚΑΣ I). Το DAG-PPT είναι ένας αντιορός αίγας από όνο, ο οποίος υπέστη κατακρήμνιση εκ των προτέρων με φυσιολογικό ορό αίγας, και επιφανειοδραστικό μέσο. Το DAG-PPT επωάζεται με τους βαθμονομητές ή τα δείγματα, το πρωτογενές αντίσωμα και τον ιχνηθέτη για τριάντα λεπτά πριν τη φυγοκέντρηση των δοκιμαστικών σωλήνων για το διαχωρισμό του δεσμευμένου και του μη δεσμευμένου ιχνηθέτη. Ο μη δεσμευμένος ιχνηθέτης απομακρύνεται με μετάγγιση του υπερκείμενου υγρού από κάθε δοκιμαστικό

σωλήνα. Γίνεται μέτρηση του δεσμευμένου ιχνηθέτη που παραμένει στα σφαιρίδια σύμπλοκου DAG-PPT με μετρητή γάμα για 1 λεπτό. Οι αριθμοί ¹²⁵I είναι αντιστρόφως ανάλογοι της ποσότητας EPO που υπάρχει σε κάθε δείγμα.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΙΤ

Πρωτεύον αντίσωμα EPO-Trac (ΚΥΑΝΟ)	1 φιαλίδιο/11 mL
Βαθμονομητές EPO-Trac (0 έως 5)	1 φιαλίδιο/11 mL, 5 φιαλίδια/2,1 mL
DAG-ppt EPO-Trac	2 φιαλίδια/35 mL
Ιχνηθέτης EPO-Trac (ΕΡΥΘΡΟΣ)	1 φιαλίδιο/11 mL
Υλικά ελέγχου EPO-Trac	2 φιαλίδια/2,1 mL
Αριθμός δοκιμών	100

ΦΥΛΑΞΗ: Μετά την παραλαβή του, το κιτ θα πρέπει να φυλάσσεται στους 2 έως 8°C. Μετά το άνοιγμα, φυλάξτε κάθε αντιδραστήριο στους 2 έως 8° έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Τα αντιδραστήρια δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε περίπτωση που παρέλθει η ημερομηνία λήξης. Η ημερομηνία λήξης του κιτ αναγράφεται στην εξωτερική ετικέτα και αντιστοιχεί στην ημερομηνία λήξης του ιχνηθέτη.

Δεν ενδείκνυται η ανάμιξη αντιδραστηρίων από διαφορετικές παρτίδες.

4.1 Βαθμονομητές EPO-Trac, 0 έως 5: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Έξι βαθμονομητές ανασυνδυασμένης ερυθροποιητίνης, σε ονομαστικές συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από περίπου 0 έως 280 mU/mL, προαραιώνονται σε ρυθμισμένο φυσιολογικό ορό με πρωτεϊνικούς σταθεροποιητές, αντιμικροβιακά μέσα και αζίδιο του νατρίου 0,1%. Οι βαθμονομητές έχουν αναφορά το 2nd IRP Erythropoietin, HUM, Urinary/Bioassay 67/343⁶ του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) και το International Calibrator for Erythropoietin, Recombinant DNA (rDNA) του ΠΟΥ (IS) – απορρέοντας κωδικός #87/684. Οι βαθμονομητές του κιτ μπορούν να εναλλάσσονται με τα δείγματα όταν χρησιμοποιούνται με τα αντιδραστήρια και τη διαδικασία λειτουργίας της παρούσας διαγνωστικής δοκιμής in vitro, όπως συνιστάται.

4.2 ¹²⁵I EPO-Trac: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη έχει σημανθεί με ιώδιο 125, 2 μCi (74 kBq), και έχει αραιωθεί σε ρυθμισμένο αλατούχο διάλυμα με πρωτεϊνικούς σταθεροποιητές, αντιμικροβιακά μέσα, αζίδιο του νατρίου 0,1% και ερυθρή βαφή Food, Drug and Cosmetic (FD & C) αρ. 40.

4.3 Πρωτογενές αντίσωμα EPO-Trac: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Αντιορός EPO ανθρώπου από αίγα αραιώνεται με ρυθμισμένο αλατούχο διάλυμα με πρωτεϊνικούς σταθεροποιητές, αντιμικροβιακά μέσα, αζίδιο του νατρίου 0,1% και κυανή βαφή FD & C αρ. 1.

4.4 Σύμπλοκο κατακρήμνισης EPO-Trac, DAG-PPT: Λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο

Αντιορός αίγας από όνο προαραιώνεται με φυσιολογικό ορό αίγας και επιφανειοδραστικό μέσο, αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα BSA-βορικών με αντιμικροβιακά μέσα και θιμεροζάλη 0,03% και υπόκειται σε λυοφιλοποίηση. Εκτελέστε ανασύσταση του φιαλιδίου με 35 mL κεκαθαρισμένο νερό. Αναμίξτε καλά έως ότου το εναιώρημα εμφανίζεται ομοιογενές και έπειτα αφήστε το ακίνητο για τουλάχιστον 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ανακινώντας το περιστασιακά. Στροβιλίστε ή αναμίξτε με έναν μικρό μαγνητικό αναδευτήρα σε πολύ χαμηλή ταχύτητα καθώς διανέμετε το DAG-PPT σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Αν τα αντιδραστήρια εμφανίζουν ενδείξεις επανυδάτωσης πριν από τη χρήση, μην τα χρησιμοποιήσετε.

4.5 Υλικά ελέγχου EPO-Trac, επίπεδα 1 και 2: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Προστίθεται ανασυνδυασμένη ανθρώπινη EPO σε ρυθμισμένο φυσιολογικό ορό για τη λήψη συγκέντρωσης εντός της καθορισμένης περιοχής τιμών που αναγράφεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης. Έχει προστεθεί αζίδιο του νατρίου 0,1% και άλλοι σταθεροποιητές.

5. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ *IN VITRO*.

Δεν προορίζεται για εσωτερική ή εξωτερική χρήση σε ανθρώπους ή ζώα.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΖΙΔΙΟ ΤΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ

ΠΡΟΣΟΧΗ: Μερικά αντιδραστήρια στο κιτ αυτό περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Το αζίδιο του νατρίου μπορεί να αντιδράσει με τις σωληνώσεις μολύβδου ή χαλκού και να σχηματίσει εξαιρετικά εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη, εκπλύνετε με άφθονη ποσότητα νερού για να εμποδίσετε τη συσσώρευση αζιδίων. Για πρόσθετες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα «Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts», στον οδηγό διαχείρισης ασφάλειας με κωδικό CDC-22 που εκδίδεται από τα Κέντρα για τον Έλεγχο και την Πρόληψη Νόσων στην Ατλάντα της Τζόρτζια, Η.Π.Α., 1976.

Φράσεις κινδύνου για επικίνδυνες ουσίες των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Οδηγία Επιτροπής 1999/45/ΕΕ)

R20/21/22 - Βλαβερό κατά την εισπνοή, σε επαφή με το δέρμα και σε περίπτωση κατάποσης.

R32 - Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια.

S28 - Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα, πλύνετε αμέσως με άφθονο νερό.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΘΙΜΕΡΟΖΑΛΗ

Μερικά αντιδραστήρια του κιτ αυτού περιέχουν θιμεροζάλη η οποία περιέχει υδράργυρο. Η διάθεση του στοιχειακού υδραργύρου, του ανόργανου υδραργύρου, των οξειδίων του υδραργύρου και των ενώσεων υδραργύρου θα πρέπει να γίνεται με αυστηρή τήρηση όλων των τοπικών, πολιτειακών και ομοσπονδιακών κανονισμών.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Το προϊόν αυτό περιέχει μια χημική ουσία η οποία είναι γνωστό από την πολιτεία της Καλιφόρνιας ότι προκαλεί συγγενείς ανωμαλίες ή άλλες αναπαραγωγικές ανωμαλίες.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΙΩΔΙΟ 125

Το κιτ αυτό περιέχει ραδιενεργό υλικό το οποίο δεν υπερβαίνει τα 2 μCi (74 kBq) σε ιώδιο 125. Κατά τη φύλαξη, το χειρισμό και τη διάθεση του υλικού αυτού, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες προφυλάξεις και καλές εργαστηριακές πρακτικές.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από γενική άδεια:

Το παρόν ραδιενεργό υλικό μπορεί να ληφθεί, να αποκτηθεί, να κατέχεται και να χρησιμοποιείται μόνο από ιατρούς, κτηνίατρους που εξασκούν κτηνιατρική ιατρική, κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία και μόνο για κλινικές ή εργαστηριακές δοκιμές *in vitro* που δεν περιλαμβάνουν την εσωτερική ή εξωτερική χορήγηση του υλικού, ή της ακτινοβολίας αυτού, σε ανθρώπους και ζώα. Η παραλαβή, η απόκτηση, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά υπόκεινται στους κανονισμούς και τη γενική άδεια της Ρυθμιστικής Επιτροπής Πυρηνικών των Η.Π.Α. (NRC) της πολιτείας στην οποία η επιτροπή έχει συνάψει συμφωνία για την άσκηση καθηκόντων αρμόδιας αρχής.

1. Η φύλαξη του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να περιοριστεί σε ειδικά επισημασμένο χώρο.
2. Η πρόσβαση σε ραδιενεργά υλικά πρέπει να περιοριστεί μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό.
3. Μη χρησιμοποιείτε πιπέτα με το στόμα σε ραδιενεργά διαλύματα.
4. Μην τρώτε ή πίνετε εντός των χώρων εργασίας που έχουν επισημανθεί ως ραδιενεργοί.
5. Οι περιοχές, όπου ενδεχομένως έχουν προκληθεί εκχύσεις, θα πρέπει να σκουπιστούν και κατόπιν να πλυθούν με αλκαλικό απορρυπαντικό ή ραδιολογικό απολυμαντικό διάλυμα. Τυχόν υάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να εκπλυθούν καλά με νερό πριν από την πλύση άλλων εργαστηριακών υάλινων σκευών.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από ειδική άδεια:

Η παραλαβή, η χρήση, η μεταφορά και η διάθεση των ραδιενεργών υλικών υπόκεινται στους κανονισμούς και τις συνθήκες της ειδικής άδειάς σας.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Το προϊόν αυτό περιέχει μια χημική ουσία η οποία είναι γνωστό από την πολιτεία της Καλιφόρνιας ότι προκαλεί καρκίνο.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Η ραδιενέργεια που αναγράφεται στο ένθετο συσκευασίας μπορεί να διαφέρει ελαφρώς από τη ραδιενέργεια που αναγράφεται στην ετικέτα συσκευασίας ή στην ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη. Η ετικέτα συσκευασίας και η ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη υποδεικνύουν την πραγματική ποσότητα ραδιενέργειας κατά την ημερομηνία βαθμονόμησης, ενώ το ένθετο συσκευασίας υποδεικνύει τη θεωρητική ραδιενέργεια του kit.

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

1. Αποφύγετε τον παφλασμό ή την παραγωγή αερολυμάτων.
2. Χρόνοι και θερμοκρασίες επώασης διαφορετικές από αυτές που καθορίζονται ενδεχομένως να παράγουν εσφαλμένα αποτελέσματα.
3. Η μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων ενδεχομένως να παράγει λανθασμένα αποτελέσματα.
4. Μην αντικαθιστάτε αντιδραστήρια με αντιδραστήρια άλλων παρτίδων ή άλλων κατασκευαστών.

6. ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

ΠΡΟΣΟΧΗ: Ο χειρισμός των δειγμάτων ασθενών και όλων των υλικών που έρχονται σε επαφή με αυτά θα πρέπει να γίνεται ως εάν δύνανται να μεταδώσουν λοίμωξη και η διάθεσή τους θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με σωστές προφυλάξεις.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ ΟΡΟΥ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να συλλεχθεί επαρκές δείγμα αίματος ασηπτικά με φλεβοπαρακέντηση σε κενό αποστειρωμένο υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα 5 ή 10 mL ώστε να αποδοθούν τουλάχιστον 400 µL ορό ή πλάσμα EDTA για κάθε προσδιορισμό (για 2 επαναλήψεις). Θα πρέπει να δοθεί προσοχή για την έγκαιρη αφαίρεση του ορού από το θρόμβο με φυγοκέντρηση προκειμένου να αποφευχθεί η αιμόλυση. Φυγοκεντρήστε τον ορό ή το πλάσμα σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά στους 760 x g*. Θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί EDTA (72 mg/5 mL αίμα) ως αντιπηκτικό για πλάσμα. Δεν απαιτούνται άλλα πρόσθετα ή συντηρητικά για τη διατήρηση της ακεραιότητας του δείγματος.

Ο ορός ή το πλάσμα EDTA θα πρέπει να τοποθετείται σε αποστειρωμένους καλυμμένους δοκιμαστικούς σωλήνες φύλαξης. Ο ορός είναι σταθερός για 7 ημέρες στους 4°C. Για μεγαλύτερους χρόνους φύλαξης, καταψύξτε στους -20°C σε κατάψυξη που δεν εκτελεί αυτόματη απόψυξη. Η DiaSorin έχει αποδείξει ότι τα δείγματα ορού είναι σταθερά για 18 μήνες όταν καταψύχονται συνεχόμενα στους -20°C. Τα δείγματα ορού δε θα πρέπει να καταψύχονται και να αποψύχονται επανειλημμένως. Όλα τα πλαστικά και υάλινα σκεύη ή άλλα υλικά που έρχονται σε επαφή με το δείγμα δεν θα πρέπει να είναι μολυσμένα.

Συνιστώνται δείγματα νηστείας, όμως δεν απαιτούνται, προκειμένου να αποφευχθεί η απρόσμενη παρεμβολή από ουσίες που είναι ευδιάλυτες σε λιπίδιο. Τα ορατά αιμολυσοποιημένα δείγματα θα πρέπει να απορριφθούν. Βρέθηκε ότι η χολερυθρίνη (<5 mg/dL) δεν παρεμβάλει στον προσδιορισμό αυτό. Δεν έχει εξεταστεί κανένα φαρμακευτικό προϊόν για παρεμβολή.

7. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ, ΟΜΩΣ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- 7.1 Γάντια από καουτσούκ ή λατέξ για να φοράτε κατά την εκτέλεση της δοκιμασίας.
- 7.2 Αναλώσιμοι δοκιμαστικοί σωλήνες από βοριοπυριτικό ύαλο, 12 x 75 χλστ.
- 7.3 Φυγοκέντρηση με ελεγχόμενη θερμοκρασία (20 έως 25°C) στην οποία μπορούν να προσαρμοστούν δοκιμαστικοί σωλήνες 12 x 75 χλστ στα 1600 ± 20 g*.
- 7.4 Μετρητής σπινθηρισμών γάμα βαθμονομημένος και με δυνατότητα μέτρησης ιωδίου 125.
- 7.5 Όργανο περιδίνησης (vortex).

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{ακτίνα σε εκατοστά}) (\text{rpm})^2$$

- 7.6 Συσκευές πιπέτας:
 α. Μικροπιπέτα βαθμονομημένη να διανέμει 200 (±4) μL.
 β. Διανομείς επαναλαμβανόμενης χορήγησης, βαθμονομημένοι ώστε να διανέμουν 100 (±2) μL και 500 (±5) μL.
- 7.7 Κεκαθαρμένο νερό για την αραίωση του DAG-PPT.
- 7.8 Χρονόμετρο με ακρίβεια ± 2 λεπτά.
- 7.9 Χαρτί ημιλογαριθμικού γραφήματος τριών κύκλων.

8. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

- 8.1 Προετοιμάστε τα άγνωστα δείγματα.
- 8.2 Τακτοποιήστε δύο πανομοιότυπους αναλώσιμους υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες 12 x 75 χλστ σύμφωνα με το σχήμα του προσδιορισμού της τελευταίας σελίδας.
- 8.3 Προσθέστε τα αντιδραστήρια ως ακολούθως:
 α. **Δοκιμαστικοί σωλήνες συνολικών κρούσεων**
 Τοποθετήστε κατά μέρος έως το βήμα 6 (χρησιμοποιείται για υπολογισμούς ποιοτικού ελέγχου - βλ. ενότητα που αφορά τον ποιοτικό έλεγχο).
 β. **Δοκιμαστικοί σωλήνες μη ειδικής δέσμευσης (NSB)**
 200 μL βαθμονομητή 0 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα
 γ. **Βαθμονομητής 0**
 200 μL βαθμονομητή 0 σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα
 δ. **Βαθμονομητές EPO-Trac (1 έως 5)**
 200 μL βαθμονομητή σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα
 ε. **Υλικά ελέγχου και άγνωστα δείγματα**
 200 μL από κάθε δείγμα ή υλικό ελέγχου σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα
- 8.4 Προσθέστε 100 μL πρωτογενές αντίσωμα EPO αίγας (κυανό) σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα εκτός από τους δοκιμαστικούς σωλήνες NSB.
- 8.5 Αναμίξτε απαλά τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε όργανο περιδίνησης (vortex) και επωάστε τους για 2 ώρες (± 10 λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 25°C).
- 8.6 Προσθέστε 100 μL ιχνηθέτη EPO (ερυθρό) σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες.
- 8.7 Αναμίξτε τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε όργανο περιδίνησης (vortex) και επωάστε για 16 έως 24 ώρες στους 2 έως 8°C.
- 8.8 Αναμίξτε δυνατά το DAG-PPT πριν τη διανομή του. Στροβιλίστε ή αναμίξτε DAG-PPT με έναν μικρό μαγνητικό αναδευτήρα σε πολύ χαμηλή ταχύτητα καθώς διανέμετε 500 μL σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες εκτός από τους δοκιμαστικούς σωλήνες ολικών κρούσεων.
- 8.9 Αναμίξτε σε όργανο περιδίνησης (vortex). Κατόπιν επωάστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες για 30 (±5) λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20 έως 25°C).
- 8.10 Φυγοκεντρήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες για 20 λεπτά με χρήση 1600 x g* στους 20 έως 25°C.
- 8.11 Τοποθετήστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες ολικών κρούσεων κατά μέρος. Κατόπιν μεταγγίστε το υπερκείμενο υγρό από τους υπόλοιπους δοκιμαστικούς σωλήνες σε δοχείο κατάλληλο για ραδιενεργά απόβλητα. Στεγνώστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες με στυπόχαρτο σε ανεστραμμένη θέση για να αφαιρέσετε τυχόν σταγόνες υπερκείμενου υγρού που ενδεχομένως να παραμένουν στο χείλος των δοκιμαστικών σωλήνων πριν τους φέρετε σε όρθια θέση.
- 8.12 Με χρήση μετρητή σπινθηρισμών γάμα, μετρήστε το ιζήμα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και τους δοκιμαστικούς σωλήνες συνολικών κρούσεων για 1 λεπτό.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{ακτίνα σε εκατοστά}) (\text{rpm})^2$$

9. ΔΙΑΔΙΚΑΣΤΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ

- 9.1 Προσθέστε κάθε κλάσμα αντιδραστήριου στο χαμηλότερο τρίτο του δοκιμαστικού σωλήνα προκειμένου να εξασφαλιστεί η πλήρης ανάμιξη των αντιδραστηρίων.
- 9.2 Αν η μετάγγιση των δοκιμαστικών σωλήνων δεν είναι δυνατή εντός 5 λεπτών από την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, οι δοκιμαστικοί σωλήνες θα πρέπει να φυγοκεντρηθούν εκ νέου πριν γίνει η μετάγγιση του υπερκείμενου κλάσματος.
- 9.3 Για να παρακολουθείτε πλήρως τη συνεπή απόδοση ενός προσδιορισμού RIA, υπάρχουν πρόσθετοι παράγοντες που πρέπει να ελέγχονται. Η DiaSorin προτείνει τακτικό έλεγχο των παρακάτω παραμέτρων για να εξασφαλιστεί η συνεπής απόδοση του kit.

α. Συνολικές κρούσεις

β. Μέγιστη δέσμευση

Μέση τιμή κρούσεων ανά λεπτό (CPM) των δοκιμαστικών σωλήνων βαθμονομητή 0 /Μέση τιμή CPM των δοκιμαστικών σωλήνων συνολικών κρούσεων.

γ. Μη ειδική δέσμευση

Μέση τιμή CPM του δοκιμαστικού σωλήνα NSB/Μέση τιμή CPM των δοκιμαστικών σωλήνων συνολικών κρούσεων.

δ. Κλίση καμπύλης βαθμονόμησης

Για παράδειγμα, παρατηρήστε τα σημεία καταστολής 80%, 50% και 20% της καμπύλης βαθμονόμησης.

10. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να περιλαμβάνει σε κάθε προσδιορισμό δύο τουλάχιστον υλικά ελέγχου για να παρακολουθεί την απόδοση του προσδιορισμού. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εμπορικά διαθέσιμα υλικά ελέγχου ή τα δύο υλικά ελέγχου αναφοράς που παρέχονται με το kit. Τα υλικά ελέγχου του kit περιέχουν EPO σε δύο συγκεντρώσεις. Τα υλικά ελέγχου του kit έχουν αξιολογηθεί από την DiaSorin χρησιμοποιώντας το kit RIA ¹²⁵I EPO-Trac της DiaSorin. Το εύρος των συγκεντρώσεων κάθε ελέγχου αναφέρεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης και δείχνει τα όρια που έχουν καθοριστεί από την DiaSorin για τιμές ελέγχων που μπορούν να επιτευχθούν σε αξιόπιστους κύκλους εξετάσεων. Θα πρέπει να τηρούνται οι πίνακες ποιοτικού ελέγχου για να παρακολουθείται η απόδοση των υλικών ελέγχου. Κάθε ξεχωριστό εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει αποδεκτά όρια απόδοσης για κάθε επίπεδο υλικών ελέγχου χρησιμοποιώντας μεθόδους βασισμένες στη στατιστική και σχεδιασμένες για να ανιχνεύουν τόσο συστηματικά όσο και τυχαία σφάλματα. Τα αποτελέσματα των υλικών ελέγχου θα πρέπει να ικανοποιούν τα κριτήρια του εργαστηρίου για αποδεκτικότητα πριν από την αναφορά των αποτελεσμάτων της δοκιμής των ασθενών.^{19,20,21}

11. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τον υπολογισμό αποτελεσμάτων ραδιοανοσοπροσδιορισμών. Κάθε μία βασίζεται στη λήψη καμπύλης βαθμονόμησης με το σχεδιασμό του βαθμού δέσμευσης συναρτήσει των δηλωμένων συγκεντρώσεων βαθμονομητών. Το γράφημα αυτό μπορεί να σχεδιαστεί σε γραμμική ή λογαριθμική κλίμακα. Κάθε μία από αυτές τις μεθόδους δίδει ουσιαστικά τις ίδιες τιμές για υλικά ελέγχου και δείγματα, αν και ορισμένοι προσδιορισμοί ενδέχεται να «προσαρμόζονται» καλύτερα σε μια συγκεκριμένη μέθοδο από μία άλλη. Η μέθοδος υπολογισμού στο εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου της DiaSorin είναι % B/B₀ [ποσότητα ιχνηθέτη δεσμευμένου με δείγμα (B), διαιρεμένη με την ποσότητα ιχνηθέτη δεσμευμένου με τον μηδενικό βαθμονομητή (B₀) x 100] (βλ. βήμα 3 παρακάτω) συναρτήσει της λογαριθμημένης συγκέντρωσης.

- 11.1 Υπολογίστε τη μέση τιμή CPM για κάθε βαθμονομητή, υλικό ελέγχου και άγνωστο δείγμα.
- 11.2 Αφαιρέστε τη μέση τιμή CPM των δοκιμαστικών σωλήνων μη ειδικής δέσμευσης (NSB) από όλες τις κρούσεις.
- 11.3 Διαιρέστε το διορθωμένο CPM για κάθε βαθμονομητή, υλικό ελέγχου ή δείγμα με το διορθωμένο CPM του βαθμονομητή 0.

$$\% B/B_0 = \frac{\text{CPM βαθμονομητή ή άγνωστου δείγματος} - \text{CPM NSB}}{\text{CPM βαθμονομητή 0} - \text{CPM NSB}} \times 100$$

- 11.4** Με χρήση χαρτιού ημιλογαριθμικού γραφήματος τριών κύκλων, σχεδιάστε το ποσοστιαίο B/B_0 για τους βαθμονομητές EPO-Trac (κάθετος άξονας) συναρτήσει της συγκέντρωσης που αναγράφεται στο φύλλο προδιαγραφών ποιοτικού ελέγχου (οριζόντιος άξονας).
- 11.5** Σχεδιάστε την καμπύλη που προσαρμόζεται καλύτερα στα σημεία (ΣΧΗΜΑ 1).
- 11.6** Υπολογίστε τις συγκεντρώσεις ερυθροποιητίνης των άγνωστων δειγμάτων με παρεμβολή από τη γραφική αναπαράσταση.
- 11.7** Αν οποιοδήποτε άγνωστο δείγμα φέρει ένδειξη $<4,4$ mU/mL, δηλ. το όριο της ανίχνευσης της δοκιμασίας αυτής, αναφέρετε την τιμή $<4,4$ mU/mL.
- 11.8** Αν η τιμή οποιουδήποτε άγνωστου δείγματος είναι μεγαλύτερη από το βαθμονομητή με την υψηλότερη τιμή, αυτό θα πρέπει να αραιωθεί με βαθμονομητή 0 EPO-Trac, αριθμός καταλόγου 23211, και να προσδιοριστεί ξανά. Αραιώσεις 1:2 και 1:5 είναι επαρκείς για τα περισσότερα δείγματα.

12. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

- 12.1** Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού αυτού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται από κοινού με τις πληροφορίες που διατίθενται από κλινικές αξιολογήσεις και άλλες διαγνωστικές διαδικασίες.
- 12.2** Δεν έχει ελεγχθεί κανένα φάρμακο για παρεμβολή του προσδιορισμού.

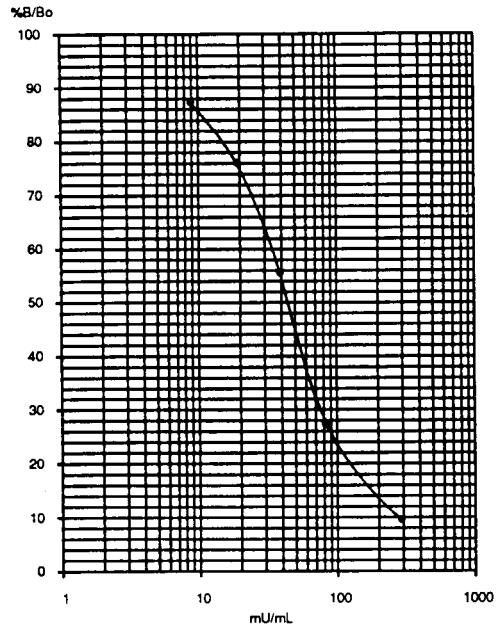
ΠΙΝΑΚΑΣ II							
Παράδειγμα δεδομένων του ραδιοανοσοπροσδιορισμού EPO-Trac™ της DiaSorin							
Δοκ. σωλήνας	CPM (mU/mL)	Μέσος όρος CPM	Μέσος όρος (CPM-NSB) (B)	Ποσοστό δεσμευμένου (B/T)**	Ποσοστό δεσμευμένου (B/B0)	Συγκ. (mU/mL)	**Διορθ. συγκ.
Συνολικές κρούσεις	14.823						
(T)14,270	14.546						
NSB	492						
	447	470		3,2**			
Βαθμονομητής 0	4.783						
	4.904	4.844	4.374 (B0)	33**	100,0	0	
Βαθμονομητές							
1	4.321						
	4.273	4.297	3.827		87,5	9,0	
2	3.832						
	3.773	3.803	3.333		76,2	19,0	
3	2.896						
	2.920	2.908	2.438		55,7	39,0	
4	1.645						
	1.669	1.657	1.187		27,1	83,0	
5	865						
	932	898	428		9,8	290,0	
Υλικό ελέγχου επιπέδου 1	3.924						
	3.877	3.901	3.431		74,4	16,9	
Υλικό ελέγχου επιπέδου 2	1.918						
	1.935	1.927	1.457		33,3	69,3	
UKN αρ. 1	1.217						
	1.232	1.225	755		17,3	127	
1:2	1.832						
	1.873	1.853	1.383		31,6	72,6	124,8
UKN αρ. 2	1.508						
	1.437	1.472	1.002		22,9	96,6	
1:2	2.264						
	2.309	2.286	1.816		41,5	56,0	91,6

Στον ΠΙΝΑΚΑ I και στο ΣΧΗΜΑ 1 παρουσιάζονται τυπικά δεδομένα ενός δείγματος και μια καμπύλη βαθμονόμησης. Οι πληροφορίες αυτές δίδονται μόνο για αναφορά και δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό καμίας τιμής.

* Διορθ. συγκ. = Διορθωμένη συγκέντρωση. Μόνο για αραιωμένα δείγματα.

** Οι παράμετροι αυτές παρακολουθούνται για σκοπούς ποιοτικού ελέγχου (βλ. ενότητα που αφορά τον ποιοτικό έλεγχο).

ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΕΡΟ



ΣΧΗΜΑ 1

* Το γράφημα αυτό παράγεται από το παράδειγμα δεδομένων (ΠΙΝΑΚΑΣ II) και προορίζεται μόνο για σκοπούς αναφοράς. Μην το χρησιμοποιήσετε για τον υπολογισμό των τιμών προσδιορισμού σας.

13. ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

13.1 Φυσιολογική περιοχή τιμών

ΚΑΘΕ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΘΑ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΚΑΘΙΕΡΩΣΕΙ ΤΗ ΔΙΚΗ ΤΟΥ ΚΑΝΟΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΙΜΩΝ.

Μετρήθηκαν τα επίπεδα ερυθροποιητίνης ορού σε εκατόν τέσσερις (104) φυσιολογικούς άνδρες και γυναίκες (45 Α, 61 Γ) από την Μινεάπολη της Μινεσότα με χρήση του ραδιοανοσοπροσδιορισμού ΕΡΟ-Trac. Η μέση τιμή ΕΡΟ βρέθηκε ίση με $17,7 \pm 7,5$ mU/mL. Οι ατομικές τιμές κυμαίνονταν από το ελάχιστο 4,9 στο μέγιστο 52,7 mU/mL. Η μέση τιμή ΕΡΟ ορού για φυσιολογικές γυναίκες ήταν 18,3, ενώ για φυσιολογικούς άνδρες ήταν 16,6 mU/mL. Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστική διαφορά ($p = 0,27$) μεταξύ των επιπέδων ΕΡΟ σε άνδρες και γυναίκες.

Αρκετές άλλες έρευνες φυσιολογικών ατόμων, με χρήση εσωτερικών ραδιοανοσοπροσδιορισμών ΕΡΟ, βρήκαν μέσα επίπεδα ΕΡΟ όμοια σε τάξη μεγέθους με τις τιμές της παραπάνω μελέτης.^{2,4,5} Μερικές από αυτές τις μελέτες απέδωσαν σημαντικές, αλλά μικρές, διαφορές μεταξύ των ανδρών και των γυναικών, και οι γυναίκες παρουσίαζαν ελαφρά χαμηλότερες τιμές από ό,τι οι άνδρες.^{8,9} Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών συνοψίζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Μελέτη	Φύλο	n=	Μέσος ± 1 Τ.Α.
Koeffler 1981 ²	και τα δύο	26	$14,9 \pm 4,2$ mU/mL
Garcia 1982 ⁴	άνδρες	364	$17,2 \pm 5,5$ mU/mL
	γυναίκες	199	$18,8 \pm 6,2$ mU/mL
Ryner 1989 ⁵	άνδρες	50	$8,0 \pm 3,2$ mU/mL
	γυναίκες	50	$11,3 \pm 3,4$ mU/mL

13.2 ΤΙΜΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΝΟΣΟΥ

Οι παθολογικές συγκεντρώσεις ΕΡΟ στο κυκλοφορικό σύστημα, όταν εξετάστηκαν με άλλες κλινικές πληροφορίες, ενδεχομένως να είναι χαρακτηριστικές συγκεκριμένων ασθενειών.

Σε εσωτερικούς ραδιοανοσοπροσδιορισμούς, οι ασθενείς με αληθή πολυκυτταραιμία συνήθως παρουσιάζουν φυσιολογικές ή χαμηλές τιμές ΕΡΟ ορού.^{8,9} Οι ασθενείς με δευτερογενή πολυκυτταραιμία που προκαλείται από υποξία, όπως σε συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια ή χρόνια αποφρακτική πνευμονική νόσο, παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα ΕΡΟ.^{3,8,9} Η εκτοπική παραγωγή ΕΡΟ μπορεί μερικές φορές να έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ΕΡΟ ορού και, ως εκ τούτου, δευτερογενή πολυκυτταραιμία σε ασθενείς με μύωμα της μήτρας, αιμαγγειοβλάστωμα της παρεγκεφαλίτιδας, ηπατικό καρκίνωμα και φαιοχρωμακύτωμα. Ο καρκίνος νεφρού, συμπεριλαμβανομένου του υπερνεφρώματος, του αδενώματος και του σαρκώματος, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τιμές ΕΡΟ όμοιες με αυτές που σχετίζονται με την ερυθροκύτωση.²

Οι περισσότεροι αναιμικοί ασθενείς έχουν αυξημένα ΕΡΟ ορού αν και το μέγεθος της αύξησης εξαρτάται από το βαθμό και τον τύπο της αναιμίας. Ενδεχομένως να βρεθούν αυξήσεις σε ΕΡΟ σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία ή λοίμωξη από τον HIV αν και τα επίπεδα ΕΡΟ, κατά μέσο όρο, είναι λιγότερο έντονα από ό,τι σε άλλους τύπους αναιμίας.^{10,11}

Θεωρείται ότι οι τύποι αναιμίας που απαντώνται σε ασθενείς με νεφροπάθεια προκαλούνται από την ελλιπή παραγωγή ερυθροποιητίνης από το πάσχον νεφρό ή από την απουσία νεφρού. Αναιμικοί ασθενείς χωρίς νεφρό που υπόκεινται σε αιμοκάθαρση έχουν χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα ΕΡΟ.¹² Από την άλλη μεριά, οι ασθενείς που εξαρτώνται από την αιμοκάθαρση, με νεφροπάθεια τελικού σταδίου, συνήθως έχουν φυσιολογική ή αυξημένη ΕΡΟ ορού. Ωστόσο, πιστεύεται ότι τα επίπεδα ΕΡΟ ορού που παρουσιάζονται στους ασθενείς αυτούς είναι ανάρμιστα χαμηλά για το βαθμό αναιμίας τους.^{12,13} Μερικές φορές, ασθενείς που έχουν υποβληθεί πρόσφατα σε μεταμοσχεύσεις νεφρού έχουν αυξημένη ΕΡΟ ορού ως ανταπόκριση της αναιμίας τους.¹⁴

Σε μια κλινική μελέτη στη Μινεάπολη της Μινεσότα, τα επίπεδα ΕΡΟ μετρήθηκαν με τον ραδιοανοσοπροσδιορισμό ΕΡΟ-Trac σε είκοσι οκτώ (28) ασθενείς με νεφρό που υφίσταται αιμοκάθαρση με νεφροπάθεια τελικού σταδίου. Τα επίπεδα ΕΡΟ ορού είχαν μέσο όρο $38,4 \pm 67,1$ mU/mL (εύρος: 10,4 έως 360,6 mU/mL), ενώ τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης είχαν μέσο όρο $9,4 \pm 1,6$ g/dL (εύρος: 6,9 έως 12,3 g/dL). Θεωρήθηκε ότι η τιμή αυτή ήταν ανάρμιστα χαμηλή για έναν πληθυσμό ασθενών με ισοδύναμο βαθμό αναιμίας, αλλά φυσιολογική νεφρική λειτουργία.^{12,15} Η μελέτη αυτή επιβεβαίωσε τα ευρήματα προηγούμενων ερευνητών σχετικά με τη σχετική ανεπάρκεια ερυθροποιητίνης σε ασθενείς που εξαρτώνται από αιμοκάθαρση.^{15,16} Επιπλέον, τα επίπεδα ερυθροποιητίνης καθορίστηκαν σε πολλές ομάδες ασθενών. Ο ακόλουθος πίνακας παρουσιάζει τα μέσα επίπεδα ΕΡΟ που μετρήθηκαν. Τα υλικά ελέγχου ασθενών επιλέχθηκαν τυχαία από τον πληθυσμό ασθενών που αξιολογήθηκε.

Συνοπτικός πίνακας των μέσων επιπέδων EPO σε διάφορες ομάδες ασθενών με χρήση του κιτ ραδιοανοσοπροσδιορισμού EPO-Trac

Διάγνωση	n	Μέσος όρος EPO (mU/mL)	T.A.
Φυσιολογικές τιμές	36	15,7	10,5
Υλικά ελέγχου ασθενή	18	18,6	11,3
Ασθενείς αιμοκάθαρσης	28	38,4	67,1
Μυελοδυσπλασία	2	651,0	887,2
Μυελοσκλήρυνση	2	116,0	147,5
Ερυθροειδής υποπλασία/απλασία	4	1545	1213
Μη-Hodgkin λέμφωμα	15	26,4	13,8
Νόσος του Hodgkin	3	29,8	31,3
Χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία	3	17,4	9,7
Μακροσφαιριναιμία	2	30,2	15,1
Μυέλωμα	3	49,7	52,3
Αιμολυτική αναιμία	3	51,4	29,2
Διάφοροι τύποι αναιμίας	10	32,2	18,9
Ερυθροκυτταρικοί ασθενείς	6	14,6	8,5
Ασθενείς με αληθή πολυκυτταραιμία	6	20,7	4,9

Τα επίπεδα ερυθροποιητίνης που παρουσιάζονται παραπάνω μπορεί να συμφωνούν ή να μη συμφωνούν με τις καταστάσεις της ασθένειας που παρατίθενται. Όλοι οι ασθενείς βρίσκονταν σε διάφορα στάδια θεραπείας τα οποία ενδεχομένως να μεταβάλλουν το επίπεδο ερυθροποιητίνης που αναμένεται για τη συγκεκριμένη κατάσταση της ασθένειάς τους. Πρέπει να εξεταστεί η κατάσταση κάθε ασθενή ξεχωριστά και η υγεία του ερυθροποιητικού συστήματός τους κατά την ερμηνεία των ειδικών επιπέδων ερυθροποιητίνης.

14. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

14.1 Επαναληψιμότητα

Απόκλιση για τον ίδιο προσδιορισμό

Ορός (τιμές = mU/mL)

	Μέση τιμή	T.A.	%Σ.Δ.**	N
ΧΑΜΗΛΗ	11,1	1,3	11,9	20
ΧΑΜΗΛΗ	12,4	1,2	10,0	20
ΧΑΜΗΛΗ	22,9	1,2	5,2	10
ΜΕΣΑΙΑ	39,9	1,9	4,8	10
ΥΨΗΛΗ	106,5	5,1	4,8	10
ΥΨΗΛΗ	254,6	29,8	11,7	20

Απόκλιση μεταξύ σειράς προσδιορισμών

Ορός (τιμές = mU/mL)

	Μέση τιμή	T.A.	%Σ.Δ.**	N
ΧΑΜΗΛΗ	9,8	1,4	14,3	5
ΧΑΜΗΛΗ	13,2	1,6	12,1	5
ΧΑΜΗΛΗ	19,0	1,3*	6,7	5
ΜΕΣΑΙΑ	40,9	1,4	3,5	5
ΥΨΗΛΗ	147,6	15,7	10,6	5
ΥΨΗΛΗ	220,2	26,9	12,2	5

* Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πέντε ξεχωριστούς προσδιορισμούς (n = 5)

** % Σ.Δ. = (T.A. ÷ Μέσο όρο) 100

14.2 ΑΛΗΘΙΝΟΤΗΤΑ: Η ΑΛΗΘΙΝΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΕΧΕΙ ΕΛΕΓΧΘΕΙ ΜΕ ΤΗΝ ΕΞΕΤΑΣΗ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ.

Παραλληλισμός αραίωσης

Μελέτη σειριακής αραίωσης άγνωστων δειγμάτων ορού

Δείγμα	Αραίωση	Μέσος όρος EPO (mU/mL)	% μέσου όρου/ μέσος όρος μηδενικής αραίωσης
1	0	15,6*	—
	1:2	17,4	111,5
2	0	127,1	—
	1:2	124,8	98,2
	1:4	141,2	111,1
	1:8	152,0	119,6
3	0	96,6	—
	1:2	91,6	94,8
	1:4	100,4	103,9
	1:8	100,0	103,5
4	0	51,3	—
	1:2	52,8	102,9
	1:4	38,4	74,9
			Μέση τιμή = 102,3

* Οι τιμές μηδενικής αραίωσης ήταν οι τιμές που μετρήθηκαν πριν από την αραίωση με το αραιωτικό ορού της DiaSorin.

Ακρίβεια

Μελέτη ανάκτησης

Ορός (Τιμές = mU/mL)

Αρ. σετ	Υπόβαθρο*	Βαθμονομητής EPO που προστέθηκε	Μετρούμενη τιμή**	Ποσοστιαία ανάκτηση***
1	8,9	19,5	27,3	94,4
	8,9	41,5	51,9	103,6
	8,9	145,0	182,0	119,4
2	18,1	19,5	37,3	98,5
	18,1	41,5	66,0	115,4
	18,1	145,0	205,6	129,3
3	44,3	19,5	62,9	95,4
	44,3	41,5	87,6	104,3
	44,3	145,0	158,5	78,8
4	80,8	19,5	101,3	105,1
	80,8	41,5	127,1	111,6
	80,8	145,0	210,7	89,6
				Μέσος όρος = 103,8

* Προσδιορισμένη τιμή δείγματος διαιρεμένη με 2.

** Αναμίχθηκε ίσος όγκος βαθμονομητής 3, 4 και 5 EPO-Trac και δείγμα ασθενή.

*** % Ανάκτηση = [(υπόβαθρο που μετρήθηκε)/EPO που προστέθηκε] x 100

14.3 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ (ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ)

Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση ΕΡΟ είναι 4,4 mU/mL, όταν ορίζεται ως η φαινομενική συγκέντρωση σε 3 απόκλισης βαθμονομητή από τις κρούσεις σε μέγιστη ή μηδενική δέσμευση. Τα άγνωστα δείγματα με τιμή μικρότερη από την ευαισθησία του προσδιορισμού αυτού θα πρέπει να αναφέρονται ως <4,4 mU/mL.

14.4 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Τα αποτελέσματα από πείραμα διασταυρούμενης αντιδραστικότητας με χρήση του συστήματος ραδιοανοσοπροσδιορισμού ΕΡΟ-Trac και 8 πρωτεϊνών που απαντώνται στη φύση παρουσίασαν <0,001% διασταυρούμενη αντιδραστικότητα όταν μετρήθηκαν στην ευαισθησία του προσδιορισμού (4,4 mU/mL).

Ουσίες	% Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα
Ανθρώπινη λευκωματίνη	<0,001
Παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (GM-CSF)	<0,001
Ιντερλευκίνη-3	<0,001
α-1 αντιθρυσίνη	<0,001
Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη	<0,001
α-1 γλυκοπρωτεϊνικό οξύ	<0,001
Ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη G	<0,001
Ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη M	<0,001

Η αλληλουχία γονιδίων της ερυθροποιητίνης συγκρίθηκε με όλες τις αλληλουχίες ανθρώπινων γονιδίων στις βάσεις δεδομένων Genbank και EMBL. Η αναζήτηση δεν βρήκε γονίδια που είναι σημαντικά όμοια με την αλληλουχία γονιδίων ερυθροποιητίνης.

14.5 ΠΑΡΕΜΒΟΛΗ

Αξιολογήθηκαν μελέτες σύμφωνα με τις μεθόδους CLSI προκειμένου να υπολογιστεί η παρεμβολή της αιμοσφαιρίνης, του τριγλυκεριδίου και της χολερυθρίνης. Οι μελέτες αυτές υποδεικνύουν ότι δεν παρατηρήθηκε καμία παρεμβολή.

14.6 ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Αποδείχθηκε ότι τα ζεύγη δειγμάτων πλάσματος EDTA και ορού συσχετίζονται σε υψηλό βαθμό.









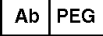
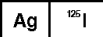





Y (ΟΡΟΣ) = $0,9 + 0,993$ (ΠΛΑΣΜΑ), $r = 0,93$ (περιοχή τιμών: 4,7 έως 42,5 mU/ mL, ορός).

ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ, ΑΝΑΤΡΕΞΤΕ ΣΤΗΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΣΕΛΙΔΑ

**REFERENCES/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAFIA/
REFERÊNCIAS/SEZNAM LITERURY/BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ**









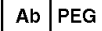
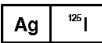





1. Golde, D.W. and J.C. Gasson, "Hormones That Stimulate the Growth of Blood Cells," **Scientific American**, p. 62, (1988).
2. Braunwald, E., K.J. Isselbacher, R.G. Petersdorf, J.D. Wilson, J.B. Martin and A.S. Fanci (eds), "Harrison's Principles of Internal Medicine," 11th Edition, **McGraw-Hill**, pp. 149, 1599, (1987).
3. Koeffler, H.P. and E. Goldwasser, "Erythropoietin Radioimmunoassay In Evaluating Patients With Polycythemia," **Annals of Internal Medicine**, 94(1):44-47, (1981).
4. Cotes, M.P., "Quantitative Estimation of Erythropoietin," **Annals of the New York Academy of Sciences**, 149:12-17, (1968).
5. Cotes, M.P. and D.R. Bangham, "Bio-assay of Erythropoietin in Mice Made Polycythaemic by Exposure to Air at Reduced Pressure," **Nature**, 191:1065-1067, (1961).
6. Cotes, A.L. and M.V. Musset, "The Second International Reference Preparation of Erythropoietin, Human, Urinary, for Bioassay," **Bull. Wild. Hlth. Org.**, 47:99-112, (1972).
7. "Radiological Health Handbook," **U.S. Dept. of Health, Education and Welfare**, Public Health Service, Publishing Number: 2016.
8. Garcia, J.F., S.N. Ebbe, L. Hollander, H.O. Cutting, M.E. Miller and E.P. Cronkite, "Radioimmunoassay of Erythropoietin: Circulating Levels in Normal and Polycythemic Human Beings," **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, 99(5):624-635, (1982).
9. Rhyner, K., F. Egli, M. Niemoller, A. Wieczorek, P. Greminger and W. Vetter, "Serum Erythropoietin Levels in Various Diseases," **Nephron**, 51 (suppl. 1) 39-46, (1989).
10. Sherwood, J.B., E. Goldwasser, R. Chilcote, L.D. Carmichael and R.L. Nagel, "Sickle Cell Anemia Patients Have Low Erythropoietin Levels for Their Degree of Anemia," **Blood**, 67(1): 46-49, (1986).
11. Spivak, J.L., D.C. Barnes, E. Fuchs and T.C. Quinn, "Serum Immunoreactive Erythropoietin in HIV-Infected Patients," **JAMA**, 261(21):3104-3107, (1989).
12. Caro, J., S. Brown, O. Miller, T. Murray and A.J. Erslev, "Erythropoietin Levels in Uremic Nephric and Anephric Patients," **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, 93(3):449-458, (1979).
13. McGonigle, R.J.S, J.D. Wallin, R.K. Shaddock and J.W. Fisher, "Erythropoietin Deficiency and Inhibition of Erythropoiesis In Renal Insufficiency," **Kidney Int.**, 25:437-444, (1984).
14. Sun, C.H., H.J. Ward, W.L. Paul, M.A. Koyle, N. Yanagawa and P.B.N. Lee, "Serum Erythropoietin Levels After Renal Transplantation," **N. Eng. J. Med.**, 321:151-157, (1989).
15. Eschbach, J.W. and J.W. Adamson, "Anemia of End-Stage Renal Disease (ESRD)," **Kidney Int.**, 28:1-5, (1985).
16. Eschbach, J.W., "The Anemia of Chronic Renal Failure: Pathophysiology and the Effects of Recombinant Erythropoietin," **Kidney Int.**, 35:134-148, (1989).

SYMBOLS USED WITH DEVICES

	English	Français	Deutsch	Español	Italiano
	European Conformity	Conformité aux normes européennes	CE – Konformitätskennzeichnung	Conformidad europea	Conformità europea
	Expiration Date	Date limite d'utilisation	Mindesthaltbarkeitsdatum	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Fabricant	Hersteller	Fabricante	Fabbricante
	Consult Instructions for Use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanweisung beachten	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnóstico in vitro.	Diagnostica in vitro.
	Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	Número de lote	Lotto n°
	Temperature limitation.	Limitation de température.	Temperaturbereich	Limitación de temperatura	Limite della temperatura
	Antiserum	Antisérum	Antiserum	Antisuero	Antisiero
	Precipitating reagent	Réactif précipitant	Fällungsreagenz	Reactivo precipitante	Reagente precipitante
	Tracer: antigen labelled with ¹²⁵ I	Traceur : antigène marqué à l'iode ¹²⁵	Tracer: ¹²⁵ I-markiertes Antigen	Trazador: antigéno etiquetado con ¹²⁵ I	Tracciatore: antigéne etichettato con ¹²⁵ I
	Calibrator	Étalon	Kalibrator	Calibrador	Calibratore
	Control serum	Sérum de contrôle	Kontrollserum	Suero de control	Siero di controllo
	Dry Natural Rubber	Caoutchouc naturel sec	Trockener Naturkautschuk	Goma natural seca	Gomma naturale secca
	Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radiactivo	Radioattivo
	Harmful	Nocif	Gesundheitsschädlich	Nocivo	Nocivo

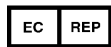
SYMBOLS USED WITH DEVICES CONTINUED ON NEXT PAGE.

CONTINUED FROM PREVIOUS PAGE - SYMBOLS USED WITH DEVICES

	Português	Cesky	Ελληνικά
	Conformidade com as normas europeias	Značka evropské shody	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Prazo de validade	Datum ukončení použitelnosti	Ημερομηνία Λήξης
	Fabricante	Výrobce	Κατασκευαστής
	Consulte as instruções de utilização	Prostudujte návod k použití	Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες Χρήσης
	Diagnóstico in vitro.	Diagnostický prostředek in vitro	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν.
	N.º do lote	Číslo šarže	Αρ. παρτίδας
	Limite de temperatura.	Teplotní limit	Περιορισμοί θερμοκρασίας
	Anti-soro	Antisérum	Αντισώμα
	Precipitado no reagente	Precipitační reagens	Αντιδραστήριο καθίζησης
	Trazador: antígeno marcado com ¹²⁵ I	Izotopový indikátor: antigen značený ¹²⁵ I	Ιχνηθέτης: Αντιγόνο σημασμένο με ¹²⁵ I
	Calibrador	Kalibrátor	Βαθμονομητής
	Soro de controlo	Kontrolní sérum	Ορός μάρτυρα
	Borracha natural seca	Suchá přírodní guma	Ξηρό φυσικό καουτσούκ
	Radioactivo	Radioaktivní	Ραδιενεργό
	Nocivo	Zdraví škodlivý	Επιβλαβής



DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285



DiaSorin S.p.A.,
13040 Saluggia (VC) Italy

Phone: 651-439-9710
FAX: 651-351-5669

For Customer Service in the U.S. and Canada Call Toll Free: 800-328-1482
In the United Kingdom Call: +44(0) 1344 401 430 FAX: +44(0) 7884 050812
12234
34658 7/10

PRINTED IN U.S.A.

