



## User's Manual


# EPO (Erythropoietin) ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Erythropoietin (EPO) in human serum

**IVD**



**REF** DEM- DE3646

 96

***Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.  
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.  
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.***

<b>Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos</b>	
1	NAME AND INTENDED USE .....3
2	SUMMARY AND EXPLANATION.....3
3	PRINCIPLE OF THE TEST .....3
4	KIT COMPONENTS.....4
5	WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS .....4
6	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE .....5
7	REAGENT PREPARATION AND STORAGE .....5
8	ASSAY PROCEDURE .....6
9	CALCULATION OF RESULTS .....7
10	QUALITY CONTROL .....9
11	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE .....9
12	EXPECTED VALUES .....9
13	PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....10
1	VERWENDUNGSZWECK .....12
2	ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG .....12
3	TESTPRINZIP .....12
4	TESTKIT-KOMPONENTEN.....13
5	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN .....13
6	PROBENENTNAHME UND LAGERUNG .....14
7	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG .....14
8	TESTVERFAHREN.....15
9	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE .....16
10	QUALITÄTSKONTROLLE .....18
11	GRENZEN DES VERFAHRENS .....18
12	ERWARTETE WERTE .....19
13	LEISTUNGSMERKMALE .....19
1	USO PREVISTO .....22
2	RIEPILOGO E SPIEGAZIONE .....22
3	PRINCIPIO DEL TEST .....22
4	COMPONENTI DEL KIT .....23
5	AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....23
6	RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE .....24
7	PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE .....24
8	PROCEDURA DI ANALISI .....25
9	CALCOLO DEI RISULTATI .....26
10	CONTROLLO QUALITÀ .....28
11	LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA .....28
12	VALORI PREVISTI .....28
13	CATTERISTICHE DELLA PROCEDURA.....29
14	REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA .....31
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS .....32

## 1 NAME AND INTENDED USE

The EPO ELISA is intended for the quantitative determination of Erythropoietin (EPO) in human serum. This assay is intended **for in vitro diagnostic use**, as an aid in the diagnosis of anemias and polycythemia. With the advent of the administration of recombinant erythropoietin as a biologic therapy to increase red blood cell mass, an erythropoietin assay may be used also to aid in the prediction and monitoring of response to recombinant erythropoietin treatment in persons with anemias.

## 2 SUMMARY AND EXPLANATION

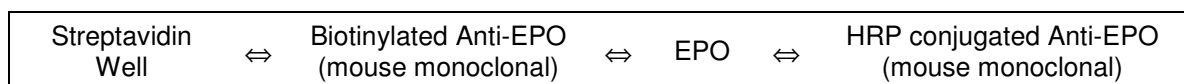
Erythropoietin (EPO) is a heavily glycosylated protein with a molecular weight of about 30,000 - 34,000 Daltons. Human EPO is a polypeptide consisting of 165 amino acids, containing one O-linked and three N-linked carbohydrate chains [1]. The recombinant EPO is a good substitute for the native protein for use in an immunoassay [2]. Serum EPO levels are dependent on the rate of production and the rate of clearance of the protein. Ninety percent of EPO is produced in the peritubular cells of the adult kidney in response to a decrease in tissue oxygenation [3,4]. There is evidence indicating that the protein on these cells which detects oxygen saturation of the blood is a heme-containing moiety [5]. As the pO<sub>2</sub> of the plasma, a function of the hematocrit decreases, EPO concentration will increase [6]. There are also observations suggesting that normally there is an inverse correlation between serum EPO levels and red blood cell mass [7].

Quantitation of serum erythropoietin concentration serves as a diagnostic adjunct in determining the cause of anemia or erythrocytosis. Aplastic anemia, hemolytic anemia and anemia due to iron deficiency all result in serum EPO elevation. Whereas, EPO levels in patients with secondary anemia due to renal failure and other disorders such as acquired immune deficiency syndrome (AIDS) are generally inappropriately low for the degree of anemia. This is mostly likely caused by an impaired ability of the diseased kidney to produce adequate quantities of EPO [8]. Low concentrations of EPO may give an early warning of kidney transplant rejection [10]. EPO also can be used to monitor AIDS patients undergoing Zidovudine (AZT) therapy. An increased concentration of EPO verifies that anemia associated with AZT therapy is due to red cell hypoplasia or aplasia [10].

Polycythemia rubra vera, or primary erythrocytosis (an increase of red blood cell mass) results from unstimulated over production of erythrocytes. Hence, the increase in the hemoglobin causes decreased production of EPO, which results in subnormal levels of serum EPO [9]. Secondary polycythemia, which are also characterized by an increase in the total red blood cell mass, occur as a physiological response to elevated levels of circulatory EPO caused by tissue hypoxia. The hypoxia may be due to such factors as pulmonary fibrosis, cardiovascular disease, prolonged exposure to high altitude, abnormal forms of hemoglobin or drug treatment [10]. Some tumors produce EPO and, in these cases, EPO may be used as a tumor marker to monitor the effectiveness of treatment.

## 3 PRINCIPLE OF THE TEST

The DEMEDITEC EPO Immunoassay is a two-site ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay] for the measurement of the biologically active 165 amino acid chain of EPO. It utilizes two different mouse monoclonal antibodies to human EPO specific for well-defined regions on the EPO molecule. One mouse monoclonal antibody to human EPO is biotinylated and the other mouse monoclonal antibody to human EPO is labeled with horseradish peroxidase [HRP] for detection.



In this assay, calibrators, controls, or patient samples are simultaneously incubated with the enzyme labeled antibody and a biotin coupled antibody in a streptavidin-coated microplate well.

At the end of the assay incubation, the microwell is washed to remove unbound components and the enzyme bound to the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stopping solution is then added to stop the reaction and converts the color to yellow.

The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of EPO in the sample. A dose response curve of absorbance unit vs. concentration is generated using results obtained from the calibrators. Concentrations of EPO present in the controls and patient samples are determined directly from this curve. The DEMEDITEC standards have been calibrated against the World Health Organization (WHO) erythropoietin international standard that consists of recombinant DNA derived EPO. The WHO reference standard used was erythropoietin 1<sup>st</sup> international standard (87/684).

#### 4 KIT COMPONENTS

Kit Components	Description	Quantity
<b>RGT 1 = Reagent 1</b> BIOTIN Ab	Biotinylated EPO Antibody [mouse monoclonal anti human EPO] containing ProClin 300 as preservative	1 x 3.5 mL
<b>RGT 2 = Reagent 2</b> PEROX Ab	Peroxidase (Enzyme) labeled EPO Antibody [mouse monoclonal anti human EPO]	1 x 3.5 mL
<b>RGT A = Reagent A</b> BUF WASH 20x	ELISA Wash Concentrate [Saline with surfactant with the preservative ciprofloxacin hydrochloride]	1 x 30 mL
<b>RGT B = Reagent B</b> SUB TMB	TMB Substrate [tetramethylbenzidine]	1 x 20 mL
<b>SOLN = Stop Solution</b> STOP SOLN	ELISA Stop Solution [1 N acidic solution]	1 x 20 mL
<b>PLA = Microplate</b> SORB MT	One holder with Streptavidin Coated Strips.	12 x 8-well strips
<b>CAL= Calibrators</b> CAL A: 0 mIU/mL B – F <i>refer to QC data sheet for exact concentrations</i>	Lyophilized synthetic h-EPO. Lyophilized Zero calibrator is a buffered protein solution and all other calibrators consist of synthetic h-EPO (1-165) in buffered protein solution. These standards have been calibrated against the World Health Organization erythropoietin 1 <sup>st</sup> international standard [recombinant DNA derived EPO] (87/684). Each calibrator contains the preservative ciprofloxacin hydrochloride	1 x 4 mL for the zero calibrator 1 x 2 mL for all other calibrators
<b>CTRL = Control 1 &amp; 2</b> CONTROL Refer to QC data sheet for exact ranges	Lyophilized. 2 Levels. Synthetic h-EPO (1-165) in a buffered protein solution. Each control contains the preservative ciprofloxacin hydrochloride	1 x 2 mL per level

#### 4.1 Materials required but not supplied

- Microplate reader capable of reading at 450 nm and 405 nm.
- Microplate washer [if washer is unavailable, manual washing is acceptable].
- Precision Pipettors to deliver 25, 200, 100 and 150 µL.
- (Optional): A multi-channel dispenser or a repeating dispenser for 25, 100 and 150 µL.
- Timer capable of ± 2 minute accuracy.
- Distilled or deionized water.
- Orbital rotator or shaker

#### 5 WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS

- For in vitro diagnostic use.
- **Potential Biohazardous Material Caution**
- Stopping Solution, consists of 1 N acidic solution. This is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves and eye protection and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation.
- **ELISA Reagent 1**  
Biotinylated EPO Antibody contains ProClin 300 as a preservative. Avoid contact and wear gloves while handling with this reagent. Promptly wash skin with mild soap and water if accidental skin contact should occur. Flush eyes with water for 15 minutes, if reagent should be in contact with eye(s). If ingested, avoid vomiting and give large amount of water. Contact a physician immediately.
- **ELISA Reagent A, Wash Concentrate, and EPO Calibrators and Controls**  
all contain ciprofloxacin hydrochloride as a preservative. Keep from personnel who have demonstrated sensitivity to Quinoline based drug products. Females who are, or may be pregnant should avoid any contact with Ciprofloxacin.

## 6 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

- The determination of EPO should be performed on human serum.
- To assay the specimen in duplicate, 400  $\mu\text{L}$  of human serum is required.
- It is highly recommended that the specimen be collected between 7:30 a.m. to 12:00 noon, because diurnal variation of erythropoietin has been reported in literature[11,12].
- Collect whole blood without anticoagulant and allow blood to clot between 2  $^{\circ}\text{C}$  - 8  $^{\circ}\text{C}$ , if possible. It has been reported that serum samples clotted at room temperature (22  $^{\circ}\text{C}$  - 28  $^{\circ}\text{C}$ ) caused a decrease in EPO value as assessed by radioimmunoassay of about 30% over clotting on ice [13]
- Then, the serum should be promptly separated, preferably in a refrigerated centrifuge, and stored at -15  $^{\circ}\text{C}$  or lower.
- Serum samples may be stored up to 24 hours at 2  $^{\circ}\text{C}$  - 8  $^{\circ}\text{C}$ .
- Serum samples frozen at -15  $^{\circ}\text{C}$  are stable for up to 12 months. Do not store samples in self-defrosting freezers.
- Avoid repeated freezing and thawing of samples. For long term storage of samples, it is recommended that samples should be aliquoted into sample tubes or vials prior to freezing.
- Prior to use, allow all specimens to come to room temperature (22  $^{\circ}\text{C}$  - 28  $^{\circ}\text{C}$ ) and mix by gentle inversion or swirling.
- Avoid grossly hemolyzed or grossly lipemic samples.

## 7 REAGENT PREPARATION AND STORAGE

Store all kit components at 2  $^{\circ}\text{C}$  - 8  $^{\circ}\text{C}$ .

1. All reagents except the calibrators, kit controls and the Wash Concentrate are ready-to-use. Store all reagents at 2  $^{\circ}\text{C}$  - 8  $^{\circ}\text{C}$ , except the Wash Concentrate, which should be kept at room temperature (22  $^{\circ}\text{C}$  - 28  $^{\circ}\text{C}$ ) until dilution to avoid precipitation.
2. For **Zero Calibrator** (Calibrator A) reconstitute vial with 4 mL of distilled or deionized water and mix. For each of the **non-zero calibrators** (Calibrator B through F) and **kit controls** 1 and 2, reconstitute each vial with 2 mL of distilled or deionized water and mix. Allow the vials to stand for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Use the calibrators and controls as soon as possible upon reconstitution.** **Freeze (-15 $^{\circ}\text{C}$ ) the remaining calibrators and controls as soon as possible after use.** Standards and controls are stable at -15  $^{\circ}\text{C}$  for 6 weeks after reconstitution with up to 3 freeze thaw cycles when handled as recommended in "Procedural Notes" section.
3. **ELISA Reagent A (Wash Concentrate)**  
Mix contents of wash concentrate thoroughly. If precipitate is present in the Wash Concentrate due to storage at lower temperature such as 4  $^{\circ}\text{C}$ , dissolve by placing the vial in a 37  $^{\circ}\text{C}$  water bath or oven with swirling or stirring.  
Add wash concentrate (30 mL) to 570 mL of distilled or deionized water and mix. The diluted working wash solution is stable for 90 days when stored at room temperature.

**8 ASSAY PROCEDURE**

1. Place sufficient **Streptavidin Coated Strips** in a holder to run all six (6) calibrators, A - F of the EPO CALIBRATORS [Exact concentration is stated on the QC data sheet], Controls and patient samples. At a minimum, designate two wells to serve as "blanks". Refer to Step 9 for final plate reading.
2. Pipet **200 µL** of calibrators, controls and samples into the designated or mapped well.  
**Freeze (-15 °C) the remaining calibrators and controls as soon as possible after use.**
3. Add or dispense **25 µL** of Reagent 1 (Biotinylated Antibody) into each of the wells which already contain the calibrators, controls and samples.
4. Add or dispense **25 µL** of Reagent 2 (Enzyme Labeled Antibody) into each of the same wells. Tap the microplate firmly against a rigid object, such as a pen, to achieve thorough mixing of the sample with Reagents. For complete assurance of mixing, repeat the tapping for a minimum of 5 times for each of the remaining three of the four sides of the plate. Be careful to avoid spillage. Cover the microplate(s) with aluminum foil or a tray to avoid exposure to light, and place it on an **orbital shaker or rotator** set at  $170 \pm 10$  rpm **for 2 hrs  $\pm$  15 min** at room temperature (22-28 °C).
5. First aspirate the fluid completely and then wash/aspirate each well **five (5) times** with the **Working Wash Solution** (prepared from Reagent A), using an automatic microplate washer. The wash solution volume should be set to dispense 0.35 mL into each well.
6. Add or dispense **150 µL** of the **ELISA Reagent B** (TMB Substrate) into each of the wells. Tap the microplate as described in Step 4.
7. With appropriate cover to avoid light exposure, place the microplate(s) on an **orbital shaker or rotator** set at  $170 \pm 10$  rpm for **30  $\pm$  5 minutes** at room temperature (22 °C - 28 °C).
8. Add or dispense **100 µL** of the Stopping Solution into each of the wells. Tap the microplate as described in Step 4. Be careful to avoid spillage.
9. Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to **450 nm**. Prior to reading, ensure both "blank wells" as mentioned in Step 1 are filled with 250 µL of distilled or deionized water. **Read** the plate **again** with the reader set to **405 nm** against distilled or deionized water.

*Note: The second reading is designed to extend the analytical validity of the calibration curve to the value represented by the highest calibrator, which is approximately 450 mIU/mL (the exact concentration is printed on the QC data sheet and will change slightly from one lot to another). Hence, patient samples with EPO > the penultimate [2nd to the highest] calibrator, i.e. Calibrator E, can be quantified against a calibration curve consisting of the readings all the way up to the concentration equivalent to the highest calibrator using the 405 nm reading, away from the wavelength of maximum absorbance. Patient and control samples should be read using the 450 nm for EPO concentrations up to the concentration of Calibrator E.*

*EPO concentrations reading above that of Calibrator E should be interpolated using the 405 nm reading.*

10. By using the final absorbance values obtained in the previous step, construct two calibration curves using 405 nm reading and 450 nm reading via cubic spline, 4 parameter logistics, or point-to-point interpolation to quantify the concentration of EPO.

## 8.1 Procedural Notes

- Samples that have values below the limit of detection (1.1 mIU/mL) should be reported as “ < 1.1 mIU/mL”.
- It is recommended that all calibrators, controls, and patient samples are assayed in duplicate, until the analyst or technician has gained sufficient experience (as evidenced by the coefficient of variation duplicate being less than 10% [except for the values below the 2nd non-zero lowest standard] and the ability to obtain results for the kit controls within the suggested acceptable ranges).
- The samples should be pipetted into the well with minimum amount of air-bubble.
- Patient samples with values greater than the highest calibrator (Calibrator F), which is approximately 450 mIU/mL (see exact concentration on the QC data sheet, because it can vary from one lot to another), must be diluted with Calibrator A (Zero Calibrator) and re-assayed. Multiply the result by the dilution factor. Alternatively, the result may be reported as greater than the highest calibrator concentration (Calibrator F).  
For example, if the Calibrator F has an assigned EPO value of 494 mIU/mL, the report should be “ > 494 mIU/mL”.
- Reagents from different lot numbers must not be interchanged.
- If preferred, mix in equal volumes, in sufficient quantities for the assay, Reagent 1 (Biotinylated Antibody) and Reagent 2 (Enzyme Labeled Antibody) in a clean amber bottle. The combined reagent is stable for seven (7) days when stored at 4 °C. Then use 50 µL of the mixed antibody into each well. This alternative method should replace Step (3) and (4), to be followed with the incubation.
- When mixing avoid splashing of reagents from wells. This will affect assay precision and accuracy.

## 9 CALCULATION OF RESULTS

### 9.1 Manual Method

1. For the 450 nm readings, construct a dose response curve (calibration curve) using the first five calibrators provided, i.e. Calibrators A, B, C, D and E. For the 405 nm readings, construct a second dose response curve using Calibrators A, D, E and F.  
Construct a dose response curve (calibration curve) using Calibrators A, B, C, D and E.
2. Assign the concentration for each calibrator stated on the vial in mIU/mL. Plot the data from the calibration curve on linear graph paper with the concentration on the X-axis and the corresponding A.U. on the Y-axis.
3. Draw a straight line between 2 adjacent points. This mathematical algorithm is commonly known as the "point-to-point" calculation. Obtain the concentration of the sample by locating the absorbance unit on the Y-axis and finding the corresponding concentration value on the X-axis. Patient and control samples should be read using the 450 nm for EPO concentrations up to the penultimate [2nd to the highest] calibrator, i.e. Calibrator E. EPO concentrations above the concentration of the penultimate calibrator (in the example shown below as 156 mIU/mL) should be interpolated using the 405 nm reading.

## 9.2 Automated Method

Computer programs using cubic spline or 4 PL [4 Parameter Logistics] or Point-to-Point can generally give a good fit. For the 450 nm readings, construct a dose response curve (calibration curve) using the first five calibrators provided, i.e. Calibrators A, B, C, D and E. For the 405 nm readings, construct a second dose response curve using Calibrators A, D, E and F.

Construct a dose response curve (calibration curve) using Calibrators A, B, C, D and E.

**Sample Data at 450 nm** [raw A.U. readout against distilled or deionized water]

Microplate Well	1 <sup>st</sup> Reading Absorbance Unit	2 <sup>nd</sup> Reading Absorbance Unit	Average Absorbance Unit	EPO mIU/mL
Calibrator A	0.006	0.006	0.006	0
Calibrator B	0.094	0.092	0.093	10.3
Calibrator C	0.232	0.219	0.226	24.8
Calibrator D	0.509	0.474	0.492	48
Calibrator E	1.918	1.799	1.859	156
Control 1	0.171	0.170	0.171	18.2
Control 2	2.27	2.20	2.24	184
Patient Sample 1	0.012	-----	0.012	1.1
Patient Sample 2	0.031	-----	0.031	3.2
Patient Sample 3	0.089	-----	0.089	9.6
Patient Sample 4	0.508	-----	0.508	50.1
Patient Sample 5	3.283	-----	3.283	>156*

\* Because the concentration of these samples are > than the concentration of Calibrator E, e.g. 156 mIU/mL, it is recommended to use the data obtained at 405 nm as shown in **Sample Data at 405 nm** in the table below.

**Sample Data at 405 nm** [raw A.U. readout against distilled or deionized water]

Microplate Well	1 <sup>st</sup> Reading Absorbance Unit	2 <sup>nd</sup> Reading Absorbance Unit	Average Absorbance Unit	EPO mIU/mL
Calibrator A	0	0	0	0
Calibrator D	0.14	0.13	0.135	48
Calibrator E	0.538	0.508	0.523	156
Calibrator F	2.06	2.03	2.04	523
Control 1	0.046	0.044	0.045	<156**
Control 2	0.649	0.626	0.638	184
Patient Sample 1	0.000	-----	0.000	<156**
Patient Sample 2	0.007	-----	0.007	<156**
Patient Sample 3	0.023	-----	0.023	<156**
Patient Sample 4	0.14	-----	0.14	<156**
Patient Sample 5	1.161	-----	1.161	302

For samples with concentrations < than the concentration of Calibrator E, e.g. 156 mIU/mL, it is recommended to use the data obtained at 450 nm as shown in **Sample Data at 450 nm** in the table above. This practice should give the results with optimum sensitivity of the assay.

*NOTE: The data presented are for illustration purposes only and must not be used in place of data generated at the time of the assay.*



## 10 QUALITY CONTROL

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results generated from the analysis of the control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. When the laboratory first introduces this EPO assay, the release of patient sample results should be based on whether the kit Control results fall within the suggested acceptable ranges. If one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the assay should be repeated. Once the laboratory has generated data of its own, the quality control parameters should be based on the statistical data by the laboratory, using either kit Control and/or serum pools made by the laboratory. Levy-Jenning plots on control results should be used. If the results for all the control samples are within mean + 2 standard deviations, with no definitive trend or bias of the quality control data, the assay should be deemed acceptable. The Westgard rule should be followed to be compliant with CLIA 88 regulations. If the control results do not fall within the stated parameters as described, assay results are invalid.

## 11 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Like any analyte used as a diagnostic adjunct, EPO results must be interpreted carefully with the overall clinical presentations and other supportive diagnostic tests. Purified IgG proteins of the same species as the ones for which the capture and the label antibodies, were derived, in addition to one commercial heterophile antibody blocker, have been incorporated in the reagents to minimize the heterophile antibodies.[14] Nonetheless, there can be no assurance that the heterophile interference has been completely eliminated. Therefore, it is recommended that at least three dilutions of any elevated and/or suspect positive results be assayed to detect non-parallelism compared to reference standards.[15] Because results obtained with one commercial EPO assay may differ significantly from those obtained with any other, it is recommended that any serial testing performed on the same patient over time should be performed with the same commercial EPO test.[16] This test may not be sufficiently sensitive to consistently discriminate abnormally low EPO values from normal levels of EPO. Lower EPO levels than expected have been seen with anemias associated with the following conditions: rheumatoid arthritis, acquired immunodeficiency syndrome, cancer, and ulcerative colitis[17], sickle cell disease, and in premature neonates.[18] After allogeneic bone marrow transplant, impaired erythropoietin response may delay erythropoietin recovery.[17] Patients with hypergammaglobulinemia associated with multiple myeloma or Waldenstrom's disease have impaired production of erythropoietin in relation to hemoglobin concentration. This has been linked to increased plasma viscosity.[17] No drugs have been investigated for assay interference. EPO levels of persons living at high altitudes with erythrocytosis may rapidly fall to normal after returning to low altitudes.[19]

## 12 EXPECTED VALUES

EPO levels were measured in 120 apparently normal individuals in the U.S. with the DEMEDITEC EPO ELISA. The samples consist of 61 males and 59 females, ranging from 18 to 96 years of age. There is no significant statistical difference on the reference ranges obtained from the female and male population of data. This finding, that there is no gender difference, is consistent with the literature [21]. Further, the EPO values do not appear to have significant age dependence, except higher values were obtained in samples from early phases of adulthood, i.e. approximately 22 to 42 years of age).

Using the nonparametric method for the analysis of reference values outlined in the NCCLS publication "How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory" (NCCLS Document C28-A, Vol. 15 No. 4) **the reference ranges (2.5 – 97.5 percentile) were 3.22 - 31.9 mIU/mL** for EPO in serum. Each laboratory should establish their own range of expected normal values.

"In patients with erythrocytosis due to uncompensated hypoxia, serum immunoreactive EPO is elevated; in those with compensated hypoxia, the serum immunoreactive EPO level is usually within the range of normal, and in patients with polycythemia vera, serum immunoreactive EPO is either normal or low. Thus, while an elevated serum EPO level suggests that erythrocytosis is a secondary phenomenon and a low EPO level supports the possibility of autonomous erythropoiesis, a normal serum EPO level excludes neither hypoxia nor autonomous EPO production as the cause of erythrocytosis." [20]

### 13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

#### 13.1 Accuracy

Eighty five (85) patient samples, with EPO values ranging from 3.8 to 304 mIU/mL, were assayed by the DEMEDITEC ELISA procedure and an ELISA EPO kit. Linear regression analysis gives the following statistics:

$$\text{DEMEDITEC ELISA} = 0.94 \text{ ELISA Kit} - 0.41 \text{ mIU/mL} \quad r = 0.989 \quad N = 85$$

#### 13.2 Sensitivity

The sensitivity, or minimum detection limit, of this assay is defined as the smallest single value, which can be distinguished from zero at the 95% confidence limit.

The DEMEDITEC EPO ELISA has a calculated sensitivity of 1.1 mIU/mL.

Hence, patient sample results below 1.1 mIU/mL should be reported as "Less than 1.1 mIU/mL."

#### 13.3 Precision and Reproducibility

The Intra-assay precision of the DEMEDITEC EPO ELISA Test was calculated from 22 replicate determinations on each of the two samples.

##### Intra-Assay Variation

Sample	Mean Value (mIU/mL)	N	Coefficient of Variation %
A	14.4	22	8.4
B	189	22	4.8

The inter-assay precision of the DEMEDITEC EPO ELISA Test was calculated from data on two samples obtained in 22 different assays.

##### Inter-Assay Variation

Sample	Mean Value (mIU/mL)	N	Coefficient of Variation %
A	20.4	22	8.8
B	183	22	5.1

#### 13.4 Specificity and Cross-Reactivity

Cross-reactivity in the EPO was studied by the addition of various substances to the Zero Calibrator (Calibrator A).

Cross reactant	Amount of Cross reactant Added
Human Transferrin	400 µg/mL
Human Bilirubin (unconjugated)	200 µg/mL
Human Hemoglobin	5 mg/mL
Human Alpha –Globulin	60 mg/mL
Human Alpha2-Macroglobulin	500 µg/mL
Human α 1-Acid Glycoprotein,	800 µg/mL
Human α 1-Antitrypsin	500 µg/mL
Triglycerides	30 mg/mL
Human Albumin	60 mg/mL
Human Gamma Globulin	60 mg/mL
ACTH (intact molecule: amino acid sequence1-39)	5,000 pg/mL
TSH	100 µIU/mL

None of the cross reactants interferes with this EPO ELISA in the concentrations studied. The very small changes in EPO seen for some cross reactants were well within the statistical limits of intra-assay variation.

**13.5 Recovery**

Various amounts of EPO were added to four different patient sera to determine the recovery. The results are described in the following table:

Serum Sample	Endogenous EPO (mIU/mL)	EPO added (mIU/mL)	Expected Value (mIU/mL)	Measured Value (mIU/mL)	Recovery (%)
A	7.9	--	--	--	--
	7.1	50.0	57.1	52.8	92.5%
	5.5	150.0	155.5	150.0	96.5%
B	6.0	--	--	--	--
	5.4	50.0	55.4	57.2	103.2%
	4.2	150.0	154.2	168.0	108.9%
C	53.6	--	--	--	--
	48.2	50.0	98.2	105.0	106.9%
	37.5	150.0	187.5	202.0	107.7%
D	0	--	--	--	--
	0	50.0	50.0	50.2	100%
	0	150.0	150.0	145.0	96.7%

**13.6 Linearity of Patient Sample Dilutions: Parallelism**

Three patient serum samples were diluted with Calibrator A (Zero Calibrator). Results in mIU/mL are shown below:

Sample	Dilution	Expected	Observed	% Observed ÷ Expected
A	Undiluted	--	247.0	--
	1:2	123.5	119.0	96%
	1:4	61.8	58.5	95%
	1:8	30.9	28.8	93%
B	Undiluted	--	139.0	--
	1:2	69.5	74.0	106%
	1:4	34.8	39.9	114%
	1:8	17.4	19.8	114%
C	Undiluted	--	>500.0	--
	1:2	--	253.0	--
	1:4	126.5	116.0	92%
	1:8	63.3	57.0	90%

**13.7 High Dose Hook Effect**

The DEMEDITEC EPO ELISA kit has exhibited no "high dose hook effect" in standard diluent spiked with 200,000 mIU/mL of EPO.

Additionally, three samples with known high EPO values (1,920 mIU/mL, 1,520 mIU/mL, and 966 mIU/mL) were tested without dilution and their results read much greater than the highest standard. Samples with EPO levels greater than the highest calibrator, however, should be diluted and re-assayed for correct values.

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Der DEMEDITEC EPO ELISA dient der quantitativen Bestimmung des Erythropoietins (EPO) in Humanserum. Dieser Test ist für die in-vitro Diagnostik vorgesehen, wo er unterstützend bei der Diagnose von Anämien und Polyzythämien eingesetzt wird. Mit Beginn der Verabreichung rekombinanten Erythropoietins als biologische Therapie zur Vermehrung der Erythrozytenmasse, werden Erythropoietin-Assays auch unterstützend bei der Prognose und Kontrolle der körpereigenen Antwort auf eine rekombinante Erythropoietin-Behandlung bei anämischen Personen eingesetzt.

## 2 ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Erythropoietin (EPO) ist ein stark glykosiliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 30000 - 34000 Dalton. Humanes EPO ist ein Polypeptid aus 165 Aminosäuren und 4 Zuckerseitenketten, von denen eine O-glykosidisch und drei N - glykosidisch mit dem Protein verbunden sind.<sup>1</sup> Rekombinantes EPO (r-EPO) ist ein geeigneter Ersatz für das körpereigene Protein zur Verwendung im Immunoassay<sup>2</sup>. EPO-Serumspiegel sind abhängig von der Rate, mit der das Protein hergestellt und wieder eliminiert wird. 90% des EPO werden in den peritubulären Zellen der erwachsenen Niere als Antwort auf eine Abnahme der Gewebsoxygenierung produziert<sup>3,4</sup>. Es gibt Hinweise darauf, dass das Protein auf diesen Zellen, welches den Grad der Sauerstoffsättigung des Bluts feststellt, eine Häm-Einheit enthält<sup>5</sup>. Während Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) des Plasmas und Hämatokritwerte sinken, steigt die EPO-Konzentration<sup>6</sup>. Eine normalerweise bestehende inverse Korrelation zwischen EPO-Serumspiegeln und Erythrozytenmasse ist ebenfalls beschrieben worden<sup>7</sup>. Die Quantifizierung des Erythropoietin-Serumspiegels dient als diagnostisches Hilfsmittel bei der Ursachenbestimmung von Anämien bzw. Erythrozytosen. Aplastische Anämien, hämolytische Anämien und Anämien aufgrund von Eisenmangel führen alle zu erhöhten Konzentrationen von EPO im Serum. Dagegen sind EPO-Spiegel von Patienten mit sekundärer Anämie aufgrund von Niereninsuffizienz und anderen Erkrankungen wie AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) für den Grad der Anämie im Allgemeinen unangemessen niedrig. Dies liegt vermutlich an einer herabgesetzten Fähigkeit der erkrankten Niere, ausreichende Mengen EPO zu produzieren<sup>8</sup>. Niedrige EPO-Spiegel können ein frühes Warnsignal für die Abstoßung eines Nierentransplantats sein<sup>10</sup>. EPO kann auch zur Überwachung von AIDS-Patienten unter Zidovudin-Therapie (AZT) eingesetzt werden. Erhöhte EPO-Werte bestätigen, dass eine mit einer AZT-Therapie einhergehende Anämie durch Hypoplasie oder Aplasie der Erythrozyten verursacht wird<sup>10</sup>. Polycythaemia rubra vera, bzw. primäre Erythrozytose (eine Vermehrung der Erythrozytenmasse), resultiert aus einer nicht-stimulierten Überproduktion von Erythrozyten. Durch die Zunahme an Hämoglobin kommt es zu einer verminderten EPO-Produktion, die in einem EPO-Serumspiegel unterhalb der normalen Werte resultiert<sup>9</sup>. Die sekundäre Polyzythämie, die ebenfalls durch einen Anstieg der Erythrozytenmasse im Blut gekennzeichnet ist, tritt als physiologische Antwort auf erhöhte Konzentrationen von zirkulierendem EPO durch Gewebshypoxie auf. Die Hypoxie kann durch Lungenfibrose, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, längere Aufenthalte in großen Höhen, anomales Hämoglobin oder medikamentöse Therapie verursacht sein<sup>10</sup>. Einige Tumore produzieren EPO. In solchen Fällen kann EPO als Tumor-Marker zur Therapieeffizienz-Kontrolle eingesetzt werden.

## 3 TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC EPO Immunoassay ist ein an zwei Stellen ansetzender ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay] zur Messung des biologisch aktiven, 165 Aminosäuren langen Erythropoietins (EPO). Im Test werden zwei verschiedene monoklonale Maus-Antikörper gegen humanes EPO verwendet, die für hinreichend definierte Regionen des EPO-Moleküls spezifisch sind. Ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes EPO ist biotinyliert und der andere monoklonale Maus- Antikörper gegen humanes EPO ist zur Erkennung mit Meerrettichperoxidase markiert.

Streptavidin-beschichtete Vertiefung	___	Biotinyliertes Anti-EPO (Maus, monoklonal)	___	EPO	___	HRP-gekoppeltes Anti-EPO (Maus, monoklonal)
---	-----	---	-----	-----	-----	--

In diesem Assay werden Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben gleichzeitig mit dem enzymgekoppelten Antikörper und einem Biotin-gekoppelten Antikörper in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation werden die Vertiefungen gewaschen, um nicht-gebundene Komponenten zu entfernen. Die an die feste Phase gebundenen Enzyme werden mit dem Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) inkubiert. Anschließend wird eine saure Stopplösung hinzugefügt, um die Reaktion anzuhalten. Die Färbung schlägt in gelb um. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration des EPO in der Probe. Unter Verwendung der mit den Kalibratoren ermittelten Ergebnisse wird eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit Absorptionseinheiten gegenüber Konzentrationen erstellt. Die EPO-Konzentrationen in Kontrollen und Patientenproben werden direkt aus dieser Kurve ermittelt. Die Standards von DEMEDITEC sind gegen den „WHO Erythropoietin International Standard“ kalibriert, der aus rekombinantem h-EPO besteht. Es wurde gegen den WHO-Referenzstandard „Erythropoietin 1st International Standard (87/684)“ kalibriert.

**4 TESTKIT-KOMPONENTEN**

Testkit - Komponenten	Bezeichnung	Menge
<b>RGT 1 = Reagenz 1</b> BIOTIN   Ab	Der biotinylierte EPO-Antikörper [monoklonales Maus-Antihuman-EPO] enthält ProClin 300 als Konservierungsmittel.	1 x 3,5 mL
<b>RGT 2 = Reagenz 2</b> PEROX   Ab	Peroxidase- (Enzym) gekoppelter EPO-Antikörper [monoklonaler Maus-Antikörper gegen h-EPO]	1 x 3,5 mL
<b>RGT A = Reagenz A</b> BUF   WASH   20x	ELISA Waschkonzentrat [saliner Puffer mit Detergenz, Ciprofloxacinhydrochlorid als Konservierungsmittel]	1 x 30 mL
<b>RGT B = Reagenz B</b> SUB   TMB	TMB-Substratlösung [Tetramethylbenzidin]	1 x 20 mL
<b>SOLN = Stopplösung</b> STOP   SOLN	ELISA Stopplösung [1 N Saure Lösung]	1 x 20 mL
<b>PLA = Mikrotiterplatte</b> SORB   MT	Eine Halterung mit Streptavidin-beschichteten Streifen	12 Streifen à 8 Vertiefungen
<b>CAL = Kalibratoren</b> CAL A: 0 mIU/mL B – F; <i>Genauere Konzentrationen auf QC Datenblatt</i>	Lyophilisiertes synthetisches h-EPO. Der lyophilisierte Null-Kalibrator ist eine gepufferte Proteinlösung und alle anderen Kalibratoren bestehen aus synthetischem h-EPO (1-165) in einer gepufferten Proteinlösung. Diese Standards wurden gegen den „WHO Erythropoietin 1 <sup>st</sup> International Standard [rh-EPO] (87/684)“ kalibriert. Jeder Kalibrator enthält das Konservierungsmittel Ciprofloxacinhydrochlorid.	1 x 4 mL für den Null-Kalibrator 1 x 2 mL für alle anderen Kalibratoren
<b>CTRL = Control 1 &amp; 2</b> CONTROL Genauere Bereiche auf QC Datenblatt	Kontrollen, lyophilisiert. 2 Level. Synthetisches h-EPO (1-165) in einer gepufferten Proteinlösung. Jede Kontrolle enthält das Konservierungsmittel Ciprofloxacinhydrochlorid.	1 x 2 mL je Level

**4.1 Weitere erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien und Geräte**

- Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Messung bei 450 nm und 405 nm
- Mikrotiterplatten-Waschgerät [falls nicht verfügbar, ist die manuelle Wäsche zulässig]
- Präzisionspipetten zur Pipettierung von 25, 200, 100 und 150 µL
- (Optional): Mehrkanaldispenser bzw. Repetierpipette für 25, 100 und 150 µL
- Zeitmesser, Genauigkeit + 2 Minuten
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Orbitalschüttler oder Rotator

**5 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

Nur in der in-vitro Diagnostik einzusetzen.

**Material mit möglicher Gesundheitsgefährdung**

Der Kalibrator A (Nullkalibrator) dieses Testkits enthält Materialien humanen Ursprungs, die bei der Überprüfung als nicht reaktiv für HBsAg, Anti-HIV 1/2 und Anti-HCV befunden wurden. Da es jedoch kein Testverfahren gibt, das das Vorhandensein von Hepatitis B Virus, HIV 1/2, HCV oder anderen infektiösen Erregern mit absoluter Sicherheit ausschließen kann, sind dieses Reagenz und die Proben als potentiell infektiöses Material zu behandeln.

Die Stopplösung besteht aus 1 N saurer Lösung. Dies ist eine starke Säure. Obwohl sie verdünnt ist, ist sie mit Sorgfalt zu handhaben. Sie kann Verätzungen verursachen. Handschuhe, Schutzbrille und entsprechende Schutzkleidung sind zu tragen. Verschüttete Säure ist vor dem Aufwischen mit großen Mengen Wasser zu verdünnen. Dämpfe nicht einatmen.

ELISA Reagenz 1. Biotinylierter EPO-Antikörper enthält ProcClin 300 als Konservierungsmittel. Kontakt vermeiden. Beim Umgang mit diesem Reagenz Handschuhe tragen. Haut sofort mit milder Seife und Wasser abwaschen, falls es zu einem Kontakt kommen sollte. Augen 15 Minuten mit fließendem Wasser ausspülen, falls es zu einem Kontakt kommen sollte. Falls Substanzen verschluckt werden, Erbrechen vermeiden. Stattdessen große Mengen Wasser verabreichen. Es ist sofort ein Arzt aufzusuchen.

ELISA Reagenz A (Waschkonzentrat) sowie EPO-Kalibratoren und Kontrollen enthalten alle Ciprofloxacinhydrochlorid als Konservierungsmittel. Von Personal fernhalten, das eine Sensitivität gegenüber Quinolol-basierten Mitteln aufweist. Schwangere Frauen bzw. Frauen mit Verdacht auf eine Schwangerschaft sollten jeglichen Umgang mit Ciprofloxacin vermeiden.

## 6 PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

Die Bestimmung von EPO ist mit Humanserum durchzuführen. Um die Proben in Doppelbestimmung zu testen, sind 400 µL Humanserum erforderlich.

Es wird empfohlen, die Proben zwischen 7.30 und 12.00 Uhr mittags zu entnehmen, da in der Literatur ein zirkadianer Rhythmus für das Erythropoietin beschrieben wird.<sup>11,12</sup>

Vollblut in einem Reagenzglas ohne Antikoagulanzen sammeln. Blut, wenn möglich, bei einer Temperatur von 2 °C - 8 °C gerinnen lassen. In Serumproben, die bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) geronnen sind, wurde ein Absinken der im Radioimmunoassay ermittelten EPO-Werte um ca. 30 % gegenüber einer Gerinnung bei starker Kühlung beschrieben.<sup>13</sup> Das Serum ist anschließend, vorzugsweise in einer Kühlzentrifuge, sofort zu trennen und bei -15 °C oder darunter zu lagern.

Serumproben können bei 2 °C - 8 °C bis zu 24 Stunden gelagert werden.

Auf -15 °C tiefgefrorene Serumproben sind bis zu 12 Monate stabil. Proben in einem Gefrierschrank ohne automatische Abtauung lagern. Wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren der Proben ist zu vermeiden. Für eine Langzeitlagerung der Proben wird empfohlen, diese vor dem Einfrieren in Reagenzröhrchen oder Flaschen zu aliquotieren.

Vor der Verwendung alle Proben auf Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) bringen. Durch vorsichtiges Überkopfdrehen oder Schwenken mischen.

Extrem hämolytische oder lipämische Proben sind zu vermeiden.

## 7 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

Alle Testkit-Komponenten bei 2 °C - 8 °C lagern.

1. Alle Reagenzien mit Ausnahme der Kalibratoren, Testkit-Kontrollen und dem Waschkonzentrat sind gebrauchsfertig. Alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C lagern.
2. Den **Nullkalibrator** (Kalibrator A) mit 4 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren und mischen. Die **Kalibratoren B bis F** und die Testkit-Kontrollen 1 und 2 mit 2 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren und mischen.

Flaschen 10 Minuten ruhen lassen. Anschließend durch vorsichtiges Überkopfdrehen gründlich mischen, um eine vollständige Rekonstitution sicherzustellen. **Kalibratoren und Kontrollen sind nach Rekonstitution sobald wie möglich zu verwenden. Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-15 °C).**

Standards und Kontrollen sind 6 Wochen nach Rekonstitution bei -15 °C stabil und können maximal dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, wenn die im Abschnitt „Verfahrenstechnische Hinweise“ gegebenen Empfehlungen beachtet werden.

3. **ELISA Reagenz A (Waschkonzentrat):** Inhalt gründlich mischen.

Ist eine Niederschlagsbildung im Waschkonzentrat auf Grund einer Lagerung bei niedrigen Temperaturen wie 4 °C eingetreten, ist das Präzipitat durch Platzieren des Gefäßes in ein Wasserbad oder einen Inkubator bei 37 °C und zusätzliches Schwenken und Rühren aufzulösen.

Waschkonzentrat (30 mL) zu 570 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser hinzufügen und mischen.

Der verdünnte Waschpuffer ist bei Raumtemperatur 90 Tage stabil.

**8 TESTVERFAHREN**

1. Eine für alle sechs (6) Kalibratoren, A – F der EPO-KALIBRATOREN [genaue Konzentrationen sind auf dem QC Datenblatt vermerkt], Kontrollen und Patientenproben ausreichende Anzahl Streptavidin-beschichteter Streifen in die Halterung einsetzen.  
Bieten verwenden Sie zwei Vertiefungen als "Leer". Siehe Schritt #9 dieses Abschnitts.
2. **200 µL** der Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die dafür vorgesehenen oder gekennzeichneten Vertiefungen pipettieren. **Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-15 °C).**
3. **25 µL** des **Reagenz 1** (biotinylierter Antikörper) in jede der Vertiefungen, die bereits die Kalibratoren, Kontrollen und Proben enthalten, pipettieren bzw. dispensieren.
4. **25 µL** des **Reagenz 2** (enzymgekoppelter Antikörper) in dieselben Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Mikrotiterplatte kräftig gegen einen festen Gegenstand, z. B. einen Stift, klopfen, um eine gründliche Vermischung der Proben und Reagenzien zu erreichen. Um eine vollständige Vermischung sicherzustellen, verbleibende drei der vier Seiten der Mikrotiterplatte ebenfalls mindestens jeweils 5 Mal gegen das Objekt klopfen. Verschütten des Gemischs vermeiden. Mikrotiterplatte(n) mit Aluminiumfolie oder einem Deckel abdecken, um Licht fernzuhalten.  
Platte **2 Stunden ±15 Minuten** bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) auf einem **Orbitalschüttler oder Rotator** bei 170 + 10 U/min inkubieren.
5. Flüssigkeit zunächst vollständig absaugen. Anschließend jede der Vertiefungen **fünf (5) Mal** mit dem **verdünnten Waschpuffer** (mit Reagenz A erstellt) in einem automatischen Waschgerät waschen/absaugen. Die Waschpuffer-Dispensionsmenge ist auf 0,35 mL je Vertiefung einzustellen.
6. **150 µL** des **ELISA Reagenz B** (TMB-Substratlösung) in jede der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Mikrotiterplatte, wie in Schritt (4) beschrieben, gegen festes Objekt klopfen.
7. Mikrotiterplatte(n) mit einer entsprechenden Abdeckung zur Vermeidung von Lichteinstrahlung **30 ± 5 Minuten** bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) auf einem **Orbitalschüttler oder Rotator** bei 170 ± 10 U/min inkubieren.
8. **100 µL** der **Stopplösung** in jede der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Mikrotiterplatte, wie in Schritt (4) beschrieben, gegen festes Objekt klopfen. Verschütten des Gemischs vermeiden.
9. Innerhalb von 10 Minuten Absorption der Lösung in den Vertiefungen bei **450 nm** im Mikrotiterplatten-Lesegerät. Vor dem Lesen, sichern dass benannte Vertiefungen als "Leer" (siehe Schritt #1) mit 250 µL destilliertes oder deionisiertes Wasser gefüllt sind. Anschließend noch einmal bei einer Wellenlänge von **405 nm**.  
*Hinweis:*  
*Die zweite Messung erfolgt, um die analytische Gültigkeit der Kalibrationskurve auf den höchsten Kalibratorwert (ca. 450 mIU/mL) auszudehnen. (Die genaue Konzentration ist auf dem QC Datenblatt vermerkt und variiert von Charge zu Charge leicht.) Somit können Patientenproben mit EPO-Werten > als der vorletzte [zweithöchste] Kalibrator, d.h. Kalibrator E, gegen eine Kalibrationskurve aus Messwerten bis zu der Konzentration, die dem höchsten Kalibrator entspricht, quantifiziert werden. Gemessen wird bei 405 nm, in sicherem Abstand von der Wellenlänge der maximalen Absorption. Patienten- und Kontrollproben sind bei EPO-Konzentrationen bis zur Konzentration von Kalibrator E bei 450 nm zu messen. EPO-Konzentrationen oberhalb von Kalibrator E werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.*
10. Unter Verwendung der im vorherigen Schritt ermittelten endgültigen Absorptionswerte können zwei Kalibrationskurven (eine bei 405 nm, die zweite bei 450 nm) mittels kubischer Spline, 4-Parameter Logistik oder Punkt-zu-Punkt-Interpolation zur Quantifizierung der EPO-Konzentration erstellt werden.

## 8.1 VERFAHRENSTECHNISCHE HINWEISE

- Proben mit Werten unterhalb der Nachweisgrenze (1,1 mIU/mL) sind als „< 1,1 mIU/mL“ im Bericht zu führen.
- Es wird empfohlen, alle Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmung zu testen, bis der Labortechniker darin ausreichend Erfahrung gesammelt hat. Diese wird durch einen in Doppelbestimmung ermittelten Variationskoeffizienten unter 10% [mit Ausnahme der Werte unterhalb des zweitniedrigsten Nicht-Nullstandards] und die Fähigkeit, Ergebnisse für die Kontrollen innerhalb des vorgegebenen Akzeptanzbereichs zu erzielen, belegt.
- Die Proben sollten bei minimaler Luftbildung in die Vertiefungen pipettiert werden.
- Patientenproben mit einer höheren Konzentration als der höchsten Kalibratorkonzentration (Kalibrator F) von ca. 450 mIU/mL (genaue Konzentrationsangaben auf dem QC Datenblatt, da Abweichungen von Charge zu Charge vorkommen) sind mit Kalibrator A (Null-Kalibrator) zu verdünnen und erneut zu testen. Das Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren. Das Ergebnis kann auch als höher als die höchste Kalibratorkonzentration (Kalibrator F) angegeben werden. Hat Kalibrator F beispielsweise einen zugewiesenen EPO-Wert von 494 mIU/mL, ist im Bericht der Wert „> 494 mIU/mL“ zu führen.
- Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht gemischt werden.
- Alternativ können für den Test ausreichende Mengen Reagenz 1 (biotinylierter Antikörper) und Reagenz 2 (enzymgekoppelter Antikörper) zu gleichen Teilen in einer sauberen brauntransparenten Flasche gemischt werden. Bei Lagerung bei 4 °C ist das Mischreagenz sieben (7) Tage stabil. Anschließend 50 µL des Gemischs in jede Vertiefung pipettieren. Diese Methode ersetzt Schritt (3) und (4) gefolgt von der Inkubation .
- Beim Mischen ist ein Verschütten der Reagenzien aus den Vertiefungen zu vermeiden. Sorgfältiges Arbeiten ist für die Präzision des Tests und die Zuverlässigkeit der Ergebnisse von großer Bedeutung.

## 9 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

### 9.1 Manuell

1. Erstellen einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Kalibrationskurve) für die Messung bei 450 nm unter Verwendung der ersten fünf im Testkit enthaltenen Kalibratoren, d. h. Kalibrator A, B, C, D und E. Erstellen einer zweiten Dosis-Wirkungs-Kurve für die Messung bei 405 nm unter Verwendung der Kalibratoren A, D, E und F.  
Konstruieren Sie eine Dosis-Wirkungs-Kurve (Kalibrationskurve) mit Kalibratoren A, B, C, D und E.
2. Jedem Kalibrator die auf dem Fläschchen in mIU/mL angegebene Konzentration zuweisen. Daten der Kalibrationskurve auf Millimeterpapier übertragen, wobei die Konzentration auf der X-Achse gegen die entsprechende Absorptionseinheit auf der Y-Achse aufzutragen ist.
3. Zwei nebeneinander liegende Punkte sind durch eine Gerade zu verbinden. Dieser mathematische Algorithmus wird als lineare Interpolation bezeichnet. Die Probenkonzentration ist durch Feststellung der Absorptionseinheit auf der Y-Achse und des zugehörigen Konzentrationswerts auf der X-Achse zu ermitteln. Patienten- und Kontrollproben sind bei EPO-Konzentrationen bis zum zweitletzten [zweithöchsten] Kalibrator, Kalibrator E, bei 450 nm zu messen. EPO-Konzentrationen oberhalb der Konzentration des zweitletzten Kalibrators (im Beispiel unten mit 156 mIU/mL angegeben) werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.



## 9.2 Automatisch

Computerprogramme, die mit kubischen Spline, 4 PL [4-Parameter Logistik] oder Punkt-zu-Punkt-Interpolation arbeiten, liefern erfahrungsgemäß gute Ergebnisse. Erstellen einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Kalibrationskurve) für die Messung bei 450 nm unter Verwendung der ersten fünf im Testkit enthaltenen Kalibratoren, d.h. Kalibrator A, B, C, D und E. Erstellen einer zweiten Dosis-Wirkungs-Kurve für die Messung bei 405 nm unter Verwendung der Kalibratoren A, D, E und F.

Konstruieren Sie eine Dosis-Wirkungs-Kurve (Kalibrationskurve) mit Kalibratoren A, B, C, D und E.

**Beispieldaten bei 450 nm** [unbearbeitete Messwerte der Absorptionseinheit gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser]

Mikrotiterplatten - Vertiefung	1.Messung Absorptionseinheit	2.Messung Absorptionseinheit	Mittlere Absorptionseinheit	EPO mIU/mL
Kalibrator A	0,006	0,006	0,006	0
Kalibrator B	0,094	0,092	0,093	10,3
Kalibrator C	0,232	0,219	0,226	24,8
Kalibrator D	0,509	0,474	0,492	48
Kalibrator E	1,918	1,799	1,859	156
Kontrolle 1	0,171	0,170	0,171	18,2
Kontrolle 2	2,270	2,200	2,240	184
Patientenprobe 1	0,012	----	0,012	1,1
Patientenprobe 2	0,031	----	0,031	3,2
Patientenprobe 3	0,089	----	0,089	9,6
Patientenprobe 4	0,508	----	0,508	50,1
Patientenprobe 5	3,283	----	3,283	>156*

\* Da die gemessene Konzentration > die Konzentration von Kalibrator E ist (hier: 156 mIU/mL), sollten die bei 405 nm ermittelten Werte angegeben werden, die nachfolgend unter **Beispieldaten bei 405 nm** aufgeführt sind.

**Beispieldaten bei 405 nm** [unbearbeitete Messwerte der Absorptionseinheit gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser]

Mikrotiterplatten - Vertiefung	1.Messung Absorptionseinheit	2.Messung Absorptionseinheit	Mittlere Absorptionseinheit	EPO mIU/mL
Kalibrator A	0,000	0,000	0,000	0
Kalibrator D	0,140	0,130	0,135	48
Kalibrator E	0,538	0,508	0,523	156
Kalibrator F	2,060	2,030	2,040	523
Kontrolle 1	0,046	0,044	0,045	<156**
Kontrolle 2	0,649	0,626	0,638	184
Patientenprobe 1	0,000	----	0,000	<156**
Patientenprobe 2	0,007	----	0,007	<156**
Patientenprobe 3	0,023	----	0,023	<156**
Patientenprobe 4	0,140	----	0,140	<156**
Patientenprobe 5	1,161	----	1,161	302

\*\*Für Proben mit einem Messwert < die Konzentration von Kalibrator E (hier: 156 mIU/mL), sollten die bei 450 nm ermittelten Werte angegeben werden, wie sie oben in der Tabelle **Beispieldaten bei 450 nm** aufgeführt sind. Durch diese Vorgehensweise wird die bestmögliche Sensitivität erreicht.

*HINWEIS: Diese Daten dienen lediglich zur Illustration. Sie sind nicht anstelle der während der Testdurchführung ermittelten Daten zu verwenden.*

## 10 QUALITÄTSKONTROLLE

Kontrollproben oder Serumpools sind in jedem Testlauf mit Kalibratoren und Patientenproben mitzuführen. Aus der Analyse der Kontrollproben gewonnene Ergebnisse sind mit Hilfe der entsprechenden statistischen Methoden auf ihre Akzeptanz auszuwerten. Führt ein Labor diesen EPO-Assay neu ein, ist die Veröffentlichung von Ergebnissen aus Patientenproben davon abhängig zu machen, ob die Ergebnisse der Testkit-Kontrollen innerhalb des vorgegebenen Akzeptanzbereichs liegen. Liegen einer oder mehrere der Probenwerte für die Qualitätskontrolle außerhalb des Akzeptanzbereichs, ist der Test zu wiederholen. Hat das Labor dann selbst Daten ermittelt, sind die Qualitätskontrollparameter auf die statistischen Daten des Labors zu basieren, wobei Testkit-Kontrollen und/oder durch das Labor erstellte Serumpools zu verwenden sind. Kontrollergebnisse sind im Levy-Jennings-Plot darzustellen. Wenn die Ergebnisse aller Kontrollproben im Bereich des Mittelwerts  $\pm 2$  Standardabweichungen ohne definitiven Trend oder Tendenz der Qualitätskontrolldaten liegen, sind die Testergebnisse als gültig anzusehen. Die Westgard-Regeln sind zur Einhaltung der CLIA'88-Vorschriften (Clinical Laboratory Improvement Amendments von 1988) zu befolgen. Wenn die Kontrollergebnisse nicht wie beschrieben innerhalb der genannten Parameter liegen, sind die Testergebnisse ungültig.

## 11 GRENZEN DES VERFAHRENS

Wie jeder als diagnostisches Hilfsmittel verwendete Analyt sind EPO-Ergebnisse sorgfältig unter Berücksichtigung des gesamten klinischen Erscheinungsbildes des Patienten und weiteren unterstützenden diagnostischen Tests zu interpretieren. Gereinigte IgG-Proteine derselben Spezies, für die die Fangantikörper und markierten Antikörper gewonnen wurden, wurden zusätzlich zu einem kommerziellen blockierenden heterophilen Antikörper in die Reagenzien gegeben, um die Anzahl heterophiler Antikörper zu minimieren.<sup>14</sup> Es gibt jedoch keine Gewährleistung dafür, dass die Interferenzen durch heterophile Antikörper vollständig beseitigt wurden. Es wird daher empfohlen, wenigstens drei Verdünnungen aller erhöhten und/oder möglicherweise positiven Ergebnisse zu testen, um Unparallelitäten im Vergleich zu den Referenzstandards festzustellen.<sup>15</sup>

Da die mit einem kommerziellen EPO-Assay ermittelten Ergebnisse erheblich von solchen in anderen Tests ermittelten abweichen können, wird empfohlen, seriell Testen desselben Patienten über einen längeren Zeitraum mit demselben kommerziellen EPO-Test durchzuführen.<sup>16</sup>

Dieser Test weist möglicherweise nicht die ausreichende Empfindlichkeit auf, um gleichbleibend ungewöhnlich niedrige EPO-Konzentrationen von normalen EPO-Werten zu unterscheiden.

Niedrigere EPO-Spiegel als erwartet wurden bei Anämien im Rahmen folgender Erkrankungen festgestellt: rheumatoide Arthritis, AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), Krebs und ulzerative Kolitis<sup>17</sup>, Sichelzellenanämie sowie bei Frühgeborenen.<sup>18</sup>

Nach einer allogenen Knochenmarkstransplantation kann durch eine beeinträchtigte Erythropoietin-Antwort die Zunahme an Erythropoietin verzögert werden.<sup>17</sup>

Patienten mit Hypergammaglobulinämie in Verbindung mit multiplen Myelomen oder der Waldenström-Krankheit zeigen eine gestörte Erythropoietin-Synthese in Relation zur Hämoglobin-Konzentration. Dies wird auf eine erhöhte Plasmaphysikosität zurückgeführt.<sup>17</sup>

Medikamente wurden nicht auf ihre Assay-Interferenz überprüft.

EPO-Spiegel von Personen, die in großen Höhen leben und eine Erythrozytose aufweisen, können schnell auf Normalwerte absinken, wenn die Personen in niedrigere Regionen zurückkehren.<sup>19</sup>

## 12 ERWARTETE WERTE

Mithilfe des DEMEDITEC EPO ELISA wurden in den USA bei hundertzwanzig (120) scheinbar gesunden Probanden EPO-Konzentrationen gemessen.

Die Proben wurden 61 männlichen und 59 weiblichen Probanden im Alter von 18 bis 96 Jahren entnommen. Es bestehen keine signifikanten statistischen Unterschiede zwischen den für die weiblichen und männlichen Probanden ermittelten Referenzbereichen. In der Literatur wird dieses Ergebnis (die Geschlechtergleichheit bezüglich EPO-Werten) bestätigt<sup>21</sup>.

Darüber hinaus zeigen die EPO-Werte keine signifikante Altersabhängigkeit, mit Ausnahme erhöhter Probenwerte bei Personen im frühen Erwachsenenalter (ungefähr zwischen 22 und 42 Jahren).

Die in der NCCLS-Veröffentlichung beschriebene non-parametrische Methode zur Analyse der Referenzwerte („How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory“ (NCCLS Document C28-A, Vol. 15 No. 4) ergab einen **Referenzbereich von 3,22 – 31,9 mIU/mL (2,5 – 97,5 Perzentile)** für EPO im Serum.

Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalwertbereich erstellen.

Patienten mit Erythrozytose aufgrund unkompensierter Hypoxie weisen erhöhte immunoreaktive EPO-Serumspiegel auf.

Patienten mit kompensierter Hypoxie zeigen üblicherweise immunoreaktive EPO-Serumspiegel im Normalbereich.

Patienten mit Polyzythämie vera weisen normale oder niedrige immunoreaktive EPO-Serumspiegel auf. Während somit ein erhöhter EPO-Serumspiegel auf eine Erythrozytose als sekundäre Erkrankung hinweist und ein niedriger EPO-Spiegel auf das mögliche Vorliegen einer autonomen Erythropoiese hindeutet, lassen sich bei normalem EPO-Serumspiegel weder Hypoxie noch autonome EPO-Produktion als Ursache einer Erythrozytose ausschließen.<sup>20</sup>

## 13 LEISTUNGSMERKMALE

### 13.1 Genauigkeit

Fünfundachtzig (85) Patientenproben mit EPO-Werten von 3,8 bis 304 mIU/mL wurden mit dem DEMEDITEC ELISA-Verfahren und einem ELISA EPO-Testkit getestet. Aus der linearen Regressionsanalyse ergeben sich die folgenden statistischen Werte:

DEMEDITEC ELISA = 0.94 ELISA Kit – 0.41 mIU/mL r = 0,989 N = 85

### 13.2 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit bzw. untere Nachweisgrenze dieses Tests ist als der kleinste Wert definiert, der auf Basis des 95%-Vertrauensbereichs vom Nullstandard unterschieden werden kann. Der DEMEDITEC EPO ELISA hat eine berechnete Empfindlichkeit von 1,1 mIU/mL. Daher sind Ergebnisse aus Patientenproben unter 1,1 mIU/mL als „< 1,1 mIU/mL“ im Bericht zu führen.

### 13.3 Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Intra-Assay-Präzision des DEMEDITEC EPO ELISA wurde durch 22 wiederholte Messungen jeder der beiden Proben ermittelt.

Intra-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert (mIU/mL)	N	Variationskoeffizient %
A	14,4	22	8,4
B	189	22	4,8

Die Inter-Assay-Präzision des DEMEDITEC EPO ELISA wurde durch die Bestimmung von zwei Proben in 22 Testansätzen ermittelt.

Inter-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert (mIU/mL)	N	Variationskoeffizient %
A	20,4	22	8,8
B	183	22	5,1

### 13.4 Spezifität und Querempfindlichkeit

Die Querempfindlichkeit des EPO ELISA wurde anhand der Zugabe unterschiedlicher Substanzen zum Nullkalibrator (Kalibrator A) untersucht.

Kreuzreaktant	Menge zugesetzten Kreuzreaktants
Humanes Transferrin	400 µg/mL
Humanes Bilirubin (unkonjugiert)	200 µg/mL
Humanes Hämoglobin	5 mg/mL
Humanes Alpha-Globulin	60 mg/mL
Humanes Alpha-2-Makroglobulin	500 µg/mL
Humanes Alpha-1-Säure Glykoprotein	800 µg/mL
Humanes Alpha-1-Antitrypsin	500 µg/mL
Triglyceride	30 mg/mL
Humanes Albumin	60 mg/mL
Humanes Gammaglobulin	60 mg/mL
ACTH (intaktes Molekül: Aminosäuresequenz 1-39)	5000 pg/mL
TSH	100 µIU/mL

Keiner der Kreuzreaktanten interferiert in diesem EPO ELISA in den untersuchten Konzentrationen. Die gemessenen sehr geringfügigen Veränderungen des EPO durch einige Kreuzreaktanten liegen innerhalb der statistischen Grenzen der Intra-Assay-Abweichung.

### 13.5 Wiederfindung

Vier verschiedene Patientenserumproben wurden zur Bestimmung der Wiederfindung mit unterschiedlichen Mengen EPO versetzt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Serumprobe	Endogenes EPO (mIU/mL)	Zugesetztes EPO (mIU/mL)	Erwarteter Wert (mIU/mL)	Gemessener Wert (mIU/mL)	Wiederfindung (%)
A	7,9	--	--	--	--
	7,1	50,0	57,1	52,8	92,5%
	5,5	150,0	155,5	150,0	96,5%
B	6,0	--	--	--	--
	5,4	50,0	55,4	57,2	103,2%
	4,2	150,0	154,2	168,0	108,9%
C	53,6	--	--	--	--
	48,2	50,0	98,2	105,0	106,9%
	37,5	150,0	187,5	202,0	107,7%
D	0	--	--	--	--
	0	50,0	50,0	50,2	100%
	0	150,0	150,0	145,0	96,7%

**13.6 Linearität von Patientenprobenverdünnungen: Parallelität**

Drei Patientenserumproben wurden mit Kalibrator A (Nullkalibrator) verdünnt. Die Ergebnisse sind nachfolgend in mIU/mL dargestellt:

Probe	Verdünnung	Erwartet mIU/mL	Beobachtet mIU/mL	% Beobachtet ÷ Erwartet
A	Unverdünnt	-	247,0	-
	1:2	123,5	119,0	96%
	1:4	61,8	58,5	95%
	1:8	30,9	28,8	93%
B	Unverdünnt	-	139,0	-
	1:2	69,5	74,0	106%
	1:4	34,8	39,9	114%
	1:8	17,4	19,8	114%
C	Unverdünnt	-	>500,0	-
	1:2	-	253,0	-
	1:4	126,5	116,0	92%
	1:8	63,3	57,0	90%

**13.7 High dose hook-Effekt“**

Der DEMEDITEC EPO ELISA zeigt keinen „High dose hook-Effekt“ in Standardverdünner, der mit 200 000 mIU/mL EPO versetzt ist. Zusätzlich wurden drei Proben mit bekannten hohen EPO-Werten (1920 mIU/mL, 1520 mIU/mL und 966 mIU/mL) ohne Verdünnung getestet. Die abgelesenen Ergebnisse lagen weit über dem höchsten Standard. Proben mit höheren EPO-Spiegeln als die des höchsten Kalibrators sind jedoch zu verdünnen und erneut auf korrekte Werte zu testen.

## 1 USO PREVISTO

Il test EPO ELISA DEMEDITEC è volto alla determinazione quantitativa di eritropoietina (EPO) nel siero umano. Questo tipo di analisi è destinato all'impiego diagnostico *in vitro*, come ausilio nella diagnosi di anemie e policitemie. Con l'introduzione della somministrazione di eritropoietina ricombinante, quale terapia biologica mirata ad aumentare la massa eritrocitaria, il saggio con eritropoietina può essere impiegato anche per la previsione e il monitoraggio della risposta al trattamento con eritropoietina ricombinante nei soggetti anemici.

## 2 RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

L'eritropoietina (EPO) è una glicoproteina con peso molecolare pari a 30.000 ~ 34.000 Dalton. L'EPO umana è un polipeptide formato da 165 aminoacidi, contenente una catena di carboidrati con legami O-glicosidici e tre catene con legami N-glicosidici<sup>1</sup>. L'EPO ricombinante è un buon sostituto della proteina naturale da utilizzare in un saggio immunoenzimatico<sup>2</sup>. I livelli di EPO nel siero dipendono dalla velocità di produzione e di depurazione della proteina. Il 90% dell'EPO è prodotto nelle cellule peritubulari del rene nell'adulto, in risposta a una diminuzione dell'ossigenazione tissutale<sup>3,4</sup>. Vi sono indicazioni che la proteina su queste cellule che rileva la saturazione di ossigeno nel sangue sia una proteina contenente un gruppo eme<sup>5</sup>. Ad una riduzione della pO<sub>2</sub> del plasma, una funzione dell'ematocrito, corrisponde un aumento della concentrazione di EPO<sup>6</sup>. Alcune osservazioni suggeriscono che normalmente si ha una correlazione inversa tra i livelli di EPO nel siero e la massa eritrocitaria<sup>7</sup>.

La quantificazione della concentrazione di eritropoietina nel siero serve come elemento diagnostico aggiuntivo per determinare la causa di anemia o eritrocitosi. Tutte le forme di anemia aplastica, emolitica e da carenza di ferro si traducono in un aumento dell'EPO nel siero. Invece, nei pazienti con anemia secondaria dovuta a insufficienza renale e con altre patologie come la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), i livelli EPO in genere sono eccessivamente bassi alla luce del grado di anemia. Con ogni probabilità ciò è dovuto all'incapacità del rene malato di produrre quantità adeguate di EPO<sup>8</sup>. Basse concentrazioni di EPO costituiscono un segnale di avvertimento precoce del rigetto nel trapianto renale<sup>10</sup>.

L'EPO inoltre può venire impiegata per monitorare i pazienti affetti da AIDS sottoposti a terapia con zidovudina (AZT). Una maggiore concentrazione di EPO verifica che l'anemia associata con il trattamento a base di AZT sia dovuta a ipoplasia o aplasia eritrocitaria<sup>10</sup>.

La policitemia vera, o eritrocitosi primaria (aumento della massa eritrocitaria) nasce da una iperproduzione non stimolata di eritrociti. Di conseguenza, l'aumento di emoglobina causa una produzione ridotta di EPO, che a sua volta determina livelli subnormali di EPO nel siero<sup>9</sup>. Le policitemie secondarie, anch'esse caratterizzate da un aumento della massa eritrocitaria totale, insorgono come risposta fisiologica a livelli elevati di EPO nel sangue dovuti a ipossia tissutale. L'ipossia può essere ricondotta a fattori quali fibrosi polmonare, disturbi cardiovascolari, esposizione prolungata ad altitudini elevate, forme anomale di emoglobina o trattamento farmacologico<sup>10</sup>. Nel caso dei tumori che producono EPO, l'EPO può essere impiegata come marker tumorale per monitorare l'efficacia della terapia.

## 3 PRINCIPIO DEL TEST

Il saggio immunoenzimatico EPO DEMEDITEC è un test ELISA (saggio di immunoassorbimento con enzima coniugato) a doppio anticorpo per la misurazione della catena di 165 aminoacidi biologicamente attiva dell'EPO. Esso impiega due diversi anticorpi monoclonali di topo contro EPO umano, specifici per regioni ben definite della molecola EPO. Un anticorpo monoclonale di tipo anti-EPO umano è biotilinato e l'altro anticorpo monoclonale di topo contro EPO umano è marcato con perossidasi di rafano [HRP].

In questo saggio, i calibratori, i controlli o i campioni paziente vengono incubati contemporaneamente con un anticorpo marcato con enzima e con uno coniugato con biotina in un pozzetto per micropiastra rivestita di streptavidina. Al termine dell'incubazione del saggio, il micropozzetto viene lavato per eliminare i residui non legati e l'enzima legato alla fase solida viene incubato con il substrato (tetrametilbenzidina, TMB). In seguito per arrestare la reazione viene aggiunta una soluzione bloccante acida, che conferisce al liquido una colorazione gialla.

L'intensità cromatica è direttamente proporzionale alla concentrazione di EPO nel campione. Sulla base dei risultati ottenuti dai calibratori viene generata una curva di risposta alla dose di unità di assorbanza in relazione alla concentrazione. Le concentrazioni di EPO presenti nei controlli e nei campioni paziente sono determinate direttamente da questa curva. Gli standard di DEMEDITEC sono stati calibrati sulla base dello standard internazionale sull'eritropoietina dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), che consiste in EPO prodotto con la tecnologia del DNA ricombinante. Lo standard di riferimento dell'OMS adottato è il primo standard internazionale sull'eritropoietina (87/684).

#### 4 COMPONENTI DEL KIT

Componenti del kit	Descrizione	Quantità
<b>RGT 1 = Reagente 1</b> BIOTIN   Ab	1 Anticorpo EPO biotinitato [anti-EPO umano monoclonale di topo] contenente ProClin 300 come conservante	1 x 3,5mL
<b>RGT 2 = Reagente 2</b> PEROX   Ab	Anticorpo EPO marcato con perossidasi (enzima) [anti-EPO umano monoclonale di topo]	1 x 3,5 mL
<b>RGT A = Reagente A</b> BUF   WASH   20x	Soluzione di lavaggio concentrata ELISA (fisiologica con tensioattivi e ciprofloxacina cloridrato come conservante)	1 x 30 mL
<b>RGT B = Reagente B</b> SUB   TMB	Substrato TMB [tetrametilbenzidina]	1 x 20 mL
<b>SOLN = Soluzione bloccante</b> STOP   SOLN	Soluzione bloccante ELISA [1 N acido soluzione]	1 x 20 mL
<b>PLA = Micropiastra</b> SORB   MT	Contenitore con strisce rivestite di streptavidina	12 strisce per 8 pozzetti
<b>CAL = Calibratori</b> CAL A: 0 mIU/mL B – F: Le concentrazioni esatte sono riportate sull' QC data sheet	h-EPO sintetico liofilizzato. Il calibratore zero iofilizzato è una soluzione proteica tamponata e tutti gli altri calibratori sono composti da h-EPO sintetico (1-165) in soluzione proteica tamponata. Questi standard sono stati calibrati sulla base dello standard internazionale sull'eritropoietina dell'Organizzazione Mondiale della Sanità [EPO prodotto con DNA ricombinante] (87/684). Ciascun calibratore contiene ciprofloxacina cloridrato come conservante	1 x 4 mL per calibratore zero 1 x 2 mL per altri calibratori
<b>CTRL = Controlli 1 e 2</b> CONTROL I valori esatti sono riportati sull' QC data sheet	Liofilizzati. 2 livelli. h EPO (1-165) sintetica in soluzione proteica tamponata. Ciascun controllo contiene ciprofloxacina cloridrato come conservante	1 x 2 mL per livello

#### 4.1 MATERIALI E STRUMENTAZIONE (NON IN DOTAZIONE)

- Lettore per micropiastre in grado di leggere a 450 nm e 405 nm.
- Lavatore per micropiastre (il lavaggio manuale è consentito in assenza di un lavatore automatico).
- Pipette di precisione per 25, 200, 100 e 150 µL.
- *Opzionale*: distributore multicanale o a ripetizione per 25, 100 e 150 µL.
- Timer con accuratezza pari a  $\pm 2$  minuti.
- Acqua distillata o deionizzata.
- Movimento orbitale o rotatorio

#### 5 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Test destinato all'impiego diagnostico *in vitro*.
- **Materiali a potenziale rischio biologico**
- La soluzione bloccante è un composto di 1 N acido soluzione, un forte acido che, anche se diluito, va trattato con grande cautela, poiché può provocare ustioni.
- Indossare un paio di guanti, occhiali e indumenti protettivi. Lavare immediatamente eventuali versamenti con abbondanti quantità di acqua. Non respirare i vapori ed evitare di inalarli.
- **Il Reagente 1 ELISA**, un anticorpo EPO biotinitato, contiene ProClin 300 come conservante. Evitare il contatto e indossare guanti protettivi quando si manipola questo reagente. In caso di contatto accidentale con la pelle, lavare immediatamente con acqua e sapone. In caso di contatto con gli occhi, lavare con acqua per 15 minuti.
- In caso di ingestione, evitare di vomitare e bere grosse quantità di acqua. Rivolgersi tempestivamente a un medico.
- **Il reagente A ELISA, la soluzione di lavaggio concentrata, i calibratori ed i controlli EPO** contengono ciprofloxacina cloridrato come conservante. Non avvicinarsi al personale che manifesta sensibilità ai farmaci a base di chinolina. Le donne in stato di gravidanza devono evitare il contatto con la ciprofloxacina.

## 6 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

La determinazione di EPO deve essere effettuata sul siero umano. Per analizzare il campione in duplicato, sono necessari 400 µL di siero umano. Si raccomanda di raccogliere il campione tra le ore 7:30 e le 12:00 del mattino, a causa della variazione diurna dell'eritropoietina (riportata in letteratura<sup>11,12</sup>).

Raccogliere il sangue intero senza anticoagulante e, se possibile, lasciare coagulare il sangue a 2 °C - 8 °C. È stato evidenziato che i campioni sierici coagulati a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) causano una diminuzione del valore EPO, come valutato dal test radioimmunologico, pari a circa il 30% rispetto alla coagulazione mediante congelamento (13).

Separare quindi tempestivamente il siero, preferibilmente in una centrifuga refrigerata, e conservare a una temperatura pari o inferiore a -15 °C. I

campioni di siero devono essere conservati a 2 °C - 8 °C per un massimo di 24 ore.

I campioni congelati a -15 °C rimangono stabili per un massimo di 12 mesi. Non conservare i campioni in congelatori con scongelamento automatico. Evitare di sottoporre i campioni a cicli ripetuti di congelamento e scongelamento. Per la conservazione a lungo termine dei campioni, prima del congelamento si raccomanda di distribuire i campioni in provette.

Prima dell'uso, portare tutti i campioni a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) e mescolare agitando delicatamente per inversione.

Evitare campioni fortemente emolizzati o lipemici.

## 7 PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE

Conservare tutti i componenti del kit a 2 °C - 8 °C.

1. Tutti i reagenti, tranne i calibratori, i controlli e la soluzione di lavaggio concentrata, sono pronti per l'uso. Conservare tutti i reagenti a 2 °C - 8 °C.

2. Ricostituire la provetta del calibratore zero (calibratore A) con 4 mL di acqua distillata o deionizzata e mescolare. Per tutti i calibratori non zero (calibratore B - F) e i controlli 1 e 2, ricostituire ciascuna provetta con 2 mL di acqua distillata o deionizzata e mescolare. Incubare le provette per 10 minuti, quindi mescolare abbondantemente agitando delicatamente per inversione per completare la ricostituzione.

**Dopo la ricostituzione, usare calibratori e controlli quanto prima. Dopo l'uso, congelare (-15 °C) al più presto i calibratori ed i controlli rimanenti.** Gli standard e i controlli sono stabili a -15 °C per 6 settimane dopo la ricostituzione, con un massimo di 3 cicli di congelamento-scongelamento, se trattati in base alle raccomandazioni riportate nella sezione "Note sulla procedura".

3. **Reagente A ELISA:** Soluzione di lavaggio concentrata: mescolare abbondantemente il contenuto della soluzione di lavaggio concentrata. In presenza di un precipitato nella soluzione di lavaggio concentrata, dovuto a conservazione a temperature inferiori (es. 4 °C), dissolvere ponendo la provetta in un bagno ad acqua o in un forno a 37 °C con agitatore. Aggiungere la soluzione di lavaggio concentrata (30 mL) a 570 mL di acqua distillata o deionizzata e mescolare. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 90 giorni se conservata a temperatura ambiente.



**8 PROCEDURA DI ANALISI**

1. Distribuire nel contenitore un numero sufficiente di **strisce rivestite di streptavidina** per eseguire tutti e sei (6) i calibratori per EPO, A ~ F tra i CALIBRATORI EPO (la concentrazione esatta è indicata sull' QC data sheet), controlli e campioni paziente.  
Come minimo, lasciare liberi due pozzetti come "bianchi". Fare riferimento al passo 9 per la lettura finale della micropiastra.
2. Pipettare **200 µL** di calibratori, controlli e campioni nel pozzetto previsto. **Dopo l'uso, congelare (-15 °C) al più presto i calibratori ed i controlli rimanenti.**
3. Aggiungere o versare **25 µL** di reagente 1 (anticorpo biotilinato) in ciascun pozzetto contenente i calibratori, controlli e campioni.
4. Aggiungere o versare **25 µL** di reagente 2 (anticorpo marcato con enzima) nei medesimi pozzetti. Battere la micropiastra con decisione contro un oggetto rigido, una penna per esempio, per ottenere una mescolatura accurata del campione con i reagenti. Per ottenere la mescolatura ottimale, ripetere questa operazione per almeno 5 volte su ciascuno dei tre lati rimanenti della piastra.  
Fare attenzione a non rovesciare il liquido. Coprire le micropiastre con una pellicola di alluminio o con una vaschetta per ripararle dalla luce. Posizionarle su un **agitatore a movimento orbitale o rotatorio** impostato su  $170 \pm 10$  giri/minuto per **2 ore  $\pm$  15 minuti** a temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  -  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
5. Aspirare completamente il liquido, quindi lavare/aspirare ogni pozzetto cinque (5) volte con la soluzione di lavaggio (preparata dal reagente A), mediante un lavatore automatico per micropiastre. Impostare il volume della soluzione di lavaggio in modo che in ciascun pozzetto vengano versati 0,35 mL.
6. Aggiungere o versare **150 µL** di **reagente B ELISA** (substrato TMB) in ogni pozzetto. Picchiettare la micropiastre come descritto nel passaggio 4.
7. Coprire le micropiastre per ripararle dalla luce e posizionarle su un **agitatore a movimento orbitale o rotatorio** impostato su  $170 \pm 10$  giri/minuto per **30  $\pm$  5 minuti** a temperatura ambiente ( $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  -  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).
8. Aggiungere o versare **100 µL** di soluzione bloccante in ogni pozzetto. Picchiettare la micropiastre come descritto nel passaggio 4. Fare attenzione a non rovesciare il liquido.
9. Leggere l'assorbanza della soluzione nei pozzetti entro 10 minuti, usando un lettore per micropiastre impostato su **450 nm**. Prima di leggere, accertarsi che entrambi i "pozzetti del bianco", come indicato al punto 1, siano riempiti con  $250\text{ }\mu\text{l}$  di acqua distillata o deionizzata. Leggere la piastra con il lettore impostato a **405 nm** contro acqua distillata o deionizzata.  
*Nota: la seconda lettura serve ad ampliare la validità analitica della curva di calibrazione al valore rappresentato dal calibratore con il livello massimo, pari a circa 450 mIU/mL (l'esatta concentrazione è riportata sull' QC data sheet e può variare leggermente da una partita all'altra). Pertanto i campioni di pazienti con un livello EPO > del penultimo calibratore (precedente quello più elevato), ossia il calibratore E, possono essere quantificati in relazione a una curva di calibrazione, costituita dai valori compresi sino all'equivalente di concentrazione del calibratore più elevato, usando il valore 405 nm, lontano dalla lunghezza d'onda della massima assorbanza. I campioni paziente e di controllo devono essere letti usando il valore 450 nm per concentrazioni di EPO sino alla concentrazione del calibratore E. Concentrazioni di EPO superiori a quella del calibratore E devono essere interpolate con il valore 405 nm.*
10. Utilizzando i valori di assorbanza finali ottenuti nella fase precedente, costruire due curve di calibrazione, usando i valori 405 nm e 450 nm mediante interpolazione con spline cubica, a 4 parametri logistici o punto-punto per quantificare la concentrazione di EPO.

## 8.1 NOTE SULLA PROCEDURA

- I campioni con valori inferiori al limite di rilevamento (1,1 mIU/mL) vanno riportati come “Inferiori a 1,1 mIU/mL”.
- Si raccomanda di analizzare tutti i calibratori, controlli e campioni paziente in duplicato, sino a che l'analista o il tecnico abbia acquisito sufficiente esperienza (come dimostrato dal fatto che il coefficiente di variazione delle analisi in duplicato è inferiore al 10% [tranne per i valori al di sotto del secondo standard più basso diverso da zero] e dalla capacità di ottenere risultati per i controlli del kit all'interno dei limiti accettabili suggeriti).
- I campioni devono essere pipettati nel pozzetto con la minima quantità possibile di bolle d'aria.
- I campioni paziente con valori superiori al calibratore più elevato (calibratore F), pari a circa 450 mIU/mL (la concentrazione esatta è indicata sull' QC data sheet e può variare da una partita all'altra), devono essere diluiti con il calibratore A (calibratore zero) e rianalizzati. Moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione. In alternativa, il risultato può essere riportato come maggiore della concentrazione del calibratore più elevato (calibratore F). Per esempio, se il calibratore F ha un valore EPO assegnato di 494 mIU/mL, va riportato “Superiori a 494 mIU/mL”.
- I reagenti con numeri di partita diversi non devono essere scambiati.
- Eventualmente mescolare, in volumi uguali e in quantità sufficienti per l'analisi, il reagente 1 (anticorpo biotinilato) e il reagente 2 (anticorpo marcato con enzima) in un flacone pulito color ambra. Il reagente combinato è stabile per sette (7) giorni se conservato a 4 °C. Quindi distribuire 50 µL dell'anticorpo mescolato in ciascun pozzetto. Questo metodo alternativo sostituisce i passaggi (3) e (4) e va seguito dall'incubazione.
- Nella fase di mescolatura evitare di spruzzare i reagenti dai pozzetti, per evitare di pregiudicare la precisione e l'accuratezza dell'analisi.

## 9 CALCOLO DEI RISULTATI

### 9.1 Metodo manuale

1. Per i valori pari a 450 nm, costruire una curva di risposta alla dose (curva di calibrazione) usando i primi cinque calibratori forniti (calibratori A, B, C, D, E). Per i valori pari a 405 nm, costruire una seconda curva di risposta alla dose, usando i calibratori A, D, E, F.  
Costruire una curva di risposta alla dose (curva di calibrazione) usando Calibratori A, B, C, D e E.
2. Assegnare la concentrazione per ogni calibratore indicata sulla provetta in mIU/mL. Su carta a scala lineare, tracciare i dati dalla curva di calibrazione con la concentrazione sull'asse delle ascisse e il corrispondente valore di assorbanza sull'asse delle ordinate.
3. Tracciare una linea retta tra 2 punti adiacenti. Questo algoritmo matematico è noto come calcolo “punto-punto”. Ottenere la concentrazione del campione individuando l'unità di assorbanza sull'asse delle ordinate e il corrispondente valore di concentrazione sull'asse delle ascisse. I campioni paziente e di controllo devono essere letti sulla base del valore 450 nm per concentrazioni di EPO sino al penultimo calibratore, ossia il calibratore E. Concentrazioni di EPO superiori a quella del penultimo calibratore (nell'esempio seguente inferiore a 156 mIU/mL) devono essere interpolate con il valore 405 nm.

## 9.2 Metodo automatico

I programmi che utilizzano l'interpolazione con spline cubica, a 4 parametri logistici o punto-punto offrono generalmente un buon adattamento. Per i valori pari a 450 nm, costruire una curva di risposta alla dose (curva di calibrazione) usando i primi cinque calibratori forniti (calibratori A, B, C, D, E). Per i valori pari a 405 nm, costruire una seconda curva di risposta alla dose, usando i calibratori A, D, E, F. Costruire una curva di risposta alla dose (curva di calibrazione) usando Calibratori A, B, C, D e E.

**Dati campione a 450 nm** (lettura unità di assorbanza grezze contro acqua distillata o deionizzata)

Pozzetto micropia-stra	1° valore Unità di assorbanza	2° valore Unità di assorbanza	Media Unità di assorbanza	EPO mIU/mL
Calibratore A	0,006	0,006	0,006	0
Calibratore B	0,094	0,092	0,093	10,3
Calibratore C	0,232	0,219	0,226	24,8
Calibratore D	0,509	0,474	0,492	48
Calibratore E	1,918	1,799	1,859	156
Controllo 1	0,171	0,170	0,171	18,2
Controllo 2	2,270	2,200	2,240	184
Campione paziente 1	0,012	----	0,012	1,1
Campione paziente 2	0,031	----	0,031	3,2
Campione paziente 3	0,089	----	0,089	9,6
Campione paziente 4	0,508	----	0,508	50,1
Campione paziente 5	3,283	----	3,283	>156*

\* Poiché la concentrazione di questi campioni è > della concentrazione del calibratore E (es. 156 mIU/mL), si raccomanda di utilizzare i dati ottenuti a 405 nm come indicato nei **Dati campione a 405 nm** nella tabella seguente.

**Dati campione a 405 nm** (lettura unità di assorbanza grezze contro acqua distillata o deionizzata)

Pozzetto micropia-stra	1° valore Unità di assorbanza	2° valore Unità di assorbanza	Media Unità di assorbanza	EPO mIU/mL
Calibratore A	0,000	0,000	0,000	0
Calibratore D	0,140	0,130	0,135	48
Calibratore E	0,538	0,508	0,523	156
Calibratore F	2,060	2,030	2,040	523
Controllo 1	0,046	0,044	0,045	<156**
Controllo 2	0,649	0,626	0,638	184
Campione paziente 1	0,000	----	0,000	<156**
Campione paziente 2	0,007	----	0,007	<156**
Campione paziente 3	0,023	----	0,023	<156**
Campione paziente 4	0,140	----	0,140	<156**
Campione paziente 5	1,161	----	1,161	302

\*\* Per i campioni con concentrazioni < della concentrazione del calibratore E (es. 156 mIU/mL), si raccomanda di utilizzare i dati ottenuti a 450 nm come indicato nei **Dati campione a 450 nm** nella prima tabella. Questo metodo fornisce risultati che garantiscono la sensibilità ottimale del saggio.

NOTA: i dati presentati sono forniti esclusivamente a scopo illustrativo e non devono essere utilizzati in sostituzione dei dati generati al momento dell'analisi.

## 10 CONTROLLO QUALITÀ

Il campioni di controllo ed i pool di siero devono essere analizzati con ciascuna seduta di calibratori e di campioni paziente. I risultati generati dall'analisi dei campioni di controllo devono essere valutati per garantirne l'accettabilità mediante metodi statistici idonei. Quando il laboratorio introduce il saggio EPO, il rilascio dei risultati dei campioni paziente si deve basare sul fatto se i risultati dei controlli del kit rientrano tra i valori accettabili suggeriti. Se uno o più dei valori del campione di controllo qualità è al di fuori dei limiti accettabili, il test va ripetuto. Una volta generati i propri dati, il laboratorio baserà i parametri del controllo qualità sui dati statistici utilizzando campioni di controllo e/o pool di siero preparati dal laboratorio. Si consiglia di utilizzare i grafici Levy-Jenning sui risultati dei controlli. Se i risultati di tutti i campioni di controllo sono compresi tra la media e  $\pm 2$  deviazioni standard, senza un trend o un errore sistematico decisivo dei dati di controllo qualità, l'analisi può essere considerata accettabile. Per assicurare la conformità alle normative CLIA 88, devono essere applicate le regole di Westgard. Se i risultati di controllo non rientrano nei parametri stabiliti descritti, i risultati dell'analisi non sono validi.

## 11 LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Analogamente a qualsiasi analita impiegato come elemento diagnostico aggiuntivo, i risultati dell'EPO vanno interpretati con attenzione, all'interno del quadro clinico complessivo e alla luce di altri test diagnostici correlati. Le proteine IgG purificate, della stessa specie di quelle per le quali sono stati derivati gli anticorpi di cattura e di rilevazione, oltre a un anticorpo bloccante eterofilo commerciale, sono state incorporate nei reagenti per ridurre al minimo gli anticorpi eterofili<sup>14</sup>. Tuttavia, non può essere garantito che l'interferenza eterofila sia stata completamente eliminata. Si raccomanda pertanto di analizzare almeno tre diluizioni dei risultati elevati e/o sospetti positivi, in modo tale da rilevare un non parallelismo rispetto agli standard di riferimento<sup>15</sup>. Poiché i risultati ottenuti con un test EPO commerciale possono differire significativamente da quelli ottenuti con altri tipi, si raccomanda di eseguire analisi seriali sullo stesso paziente nel corso del tempo con lo stesso test EPO commerciale<sup>16</sup>.

Questo test potrebbe non essere sufficientemente sensibile per discriminare in modo coerente i valori EPO eccessivamente bassi dai livelli normali.

Livelli EPO più bassi del previsto sono stati rilevati in presenza di anemie associate alle seguenti condizioni: artrite reumatoide, sindrome da immunodeficienza acquisita, cancro, colite ulcerosa<sup>17</sup>, anemia falciforme e nei neonati prematuri<sup>18</sup>.

Dopo trapianto di midollo osseo allogenico, un'alterata risposta all'eritropoietina può ritardare il recupero<sup>17</sup>. I pazienti affetti da ipergammaglobulinemia associata a mieloma multiplo o macroglobulinemia di Waldenström manifestano una ridotta produzione di eritropoietina in rapporto alla concentrazione di emoglobina. Si tratta di un fenomeno legato a un incremento della viscosità del plasma<sup>17</sup>.

Non sono stati esaminati farmaci per determinare l'interferenza dell'analisi. I livelli di EPO in soggetti residenti ad altitudini elevate e affetti da eritrocitosi possono abbassarsi rapidamente ai livelli normali a basse altitudini<sup>19</sup>.

## 12 VALORI PREVISTI

I livelli di EPO sono stati misurati mediante il test EPO ELISA in 120 individui in condizioni apparentemente normali negli Stati Uniti. La popolazione di pazienti è formata da 61 uomini e 59 donne, di età compresa fra 18 e 96 anni. Non è stata rilevata una differenza statistica significativa sui valori di riferimento ottenuti dalla popolazione femminile e maschile di dati. Il fatto che non vi sia una differenza tra i sessi è confermato dalla letteratura<sup>21</sup>. Inoltre, i valori EPO non mostrano legami significativi con l'età, ad eccezione di valori più elevati ottenuti in campioni prelevati nella fascia dell'età adulta compresa tra i 22 e i 42 anni. In base al metodo non parametrico per l'analisi dei valori di riferimento, definiti nella pubblicazione NCCLS "How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory" (documento NCCLS C28-A, Vol. 15 N. 4) i **valori di riferimento (2,5 – 97,5 percentile) erano compresi tra 3,22 e 31,9 mIU/mL** per l'EPO nel siero. Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire il proprio intervallo di valori normali previsti.

“Nei pazienti affetti da eritrocitosi dovuta a ipossia non compensata, il livello di EPO immunoreattiva nel siero è elevata; mentre nei soggetti con ipossia compensata il livello di EPO immunoreattiva nel siero in genere è compresa nei livelli normali, e nei pazienti con policitemia vera, tali livelli sono normali o bassi. Pertanto, mentre un livello elevato di EPO nel siero è suggestivo di un'eritrocitosi come fenomeno secondario e un livello basso di EPO avvalorare la possibilità di eritropoiesi autonoma, un livello normale di EPO non esclude né l'ipossia né la produzione autonoma di EPO come causa dell'eritrocitosi”<sup>20</sup>.

### 13 CARATTERISTICHE DELLA PROCEDURA

#### 13.1 Accuratezza

Ottantacinque (85) campioni di pazienti, con valori di EPO compresi tra 3,8 e 304 mIU/mL, sono stati analizzati mediante la procedura ELISA e un kit EPO ELISA.

L'analisi di regressione lineare fornisce i seguenti dati statistici:

DEMEDIATEC ELISA = 0.94 ELISA Kit – 0.41 mIU/mL

$r = 0.989$        $N = 85$

#### 13.2 Sensibilità

La sensibilità, o limite di rilevabilità, di questo saggio è definita come singolo valore minimo distinguibile dallo zero a un limite di confidenza del 95%. Il test EPO ELISA DEMEDIATEC ha una sensibilità calcolata pari a 1,1 mIU/mL quando si utilizza il Calibratore E come il calibratore più basso. Di conseguenza, i risultati di campioni di pazienti inferiori a 1,1 mIU/mL vanno riportati come "Inferiori a 1,1 mIU/mL."

#### 13.3 Precisione e Riproducibilità

La precisione intra-saggio del test EPO ELISA DEMEDIATEC è stata calcolata da 22 determinazioni replicate su ciascuno dei due campioni.

##### Variatione intra-saggio

Campione	Valore Medio (mIU/mL)	N	Coefficiente di variazione %
A	14,4	22	8,4
B	189	22	4,8

La precisione inter-saggio del test EPO ELISA di DEMEDIATEC è stata calcolata dai dati di due campioni ottenuti in 22 saggi diversi.

##### Variatione inter-saggio

Campione	Valore Medio (mIU/mL)	N	Coefficiente di variazione %
A	20,4	22	8,8
B	183	22	5,1

#### 13.4 Specificità e reattività incrociata

La reattività incrociata nell'EPO è stata analizzata aggiungendo varie sostanze al calibratore zero (calibratore A).

Cross-reagente	Quantità di cross-reagente aggiunto
Transferrina umana	400 µg/mL
Bilirubina umana (non coniugata)	200 µg/mL
Emoglobina umana	5 mg/mL
Alfa globulina umana	60 mg/mL
Alfa 2 macroglobulina	500 µg/mL
Alfa 1 Glicoproteina acida umana	800 µg/mL
Alfa 1 antitripsina umana	500 µg/mL
Trigliceridi	30 mg/mL
Albumina umana	60 mg/mL
Gamma globulina umana	60 mg/mL
ACTH (molecola intatta: sequenza aminoacidica 1-39)	5000 pg/mL
TSH	100 µIU/mL

Nessun cross-reagente interferisce con il test EPO ELISA nelle concentrazioni esaminate. Le minime variazioni di EPO riscontrate per alcuni cross-reagenti sono comprese nei limiti statistici della variazione intra-saggio.

**13.5 Recupero**

Campione sierico	Endogeno EPO (mIU/mL)	EPO aggiunto (mIU/mL)	Valore previsto (mIU/mL)	Valore misurato (mIU/mL)	Recupero (%)
A	7.9	--	--	--	--
	7.1	50.0	57.1	52.8	92.5%
	5.5	150.0	155.5	150.0	96.5%
B	6.0	--	--	--	--
	5.4	50.0	55.4	57.2	103.2%
	4.2	150.0	154.2	168.0	108.9%
C	53.6	--	--	--	--
	48.2	50.0	98.2	105.0	106.9%
	37.5	150.0	187.5	202.0	107.7%
D	0	--	--	--	--
	0	50.0	50.0	50.2	100%
	0	150.0	150.0	145.0	96.7%

Per determinare il recupero, al siero di quattro pazienti diversi sono state aggiunte varie quantità di EPO. I risultati sono descritti nella tabella seguente:

**13.6 Linearità delle diluizioni del campione paziente: parallelismo**

I campioni sierici di tre pazienti sono stati diluiti con il calibratore A (calibratore zero). I risultati, espressi in mIU/mL, sono indicati di seguito:

Campione	Diluizione	Previsto	Osservato	% osservato + previsto
A	Non diluito	--	247.0	--
	1:2	123.5	119.0	96%
	1:4	61.8	58.5	95%
	1:8	30.9	28.8	93%
B	Non diluito	--	139.0	--
	1:2	69.5	74.0	106%
	1:4	34.8	39.9	114%
	1:8	17.4	19.8	114%
C	Non diluito	--	>500.0	--
	1:2	--	253.0	--
	1:4	126.5	116.0	92%
	1:8	63.3	57.0	90%











**13.7 Effetto gancio ad alte dosi**

Il kit EPO ELISA DEMEDITEC non rivela un "effetto gancio ad alte dosi" nel diluente standard combinato con 200.000 mIU/mL di EPO. Inoltre, tre campioni con valori elevati di EPO (1.920 mIU/mL, 1.520 mIU/mL e 966 mIU/mL) sono stati analizzati senza diluizione e i risultati si sono dimostrati decisamente superiori allo standard più elevato. Tuttavia, i campioni con livelli di EPO superiori al calibratore più elevato devono essere diluiti e riesaminati per produrre valori corretti.

**14 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA**

1. Sawyer, S.T., Krantz, S.B., Sawada, K. *Receptors for Erythropoietin in Mouse and Human Erythroid Cells and Placenta.* **Blood** 1989; 74: 103-109.
2. Imai, N., Kawamura, A., Higuchi, M., et al. *Physicochemical and Biological Comparison of Recombinant Human Erythropoietin with Human Urinary Erythropoietin.* **J Biochem** 1990; 107: 352-359.
3. Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Fried, W., Pizak, L.F. *The Role of the Kidney in Erythropoiesis.* **Nature** 1957; 179: 633-634.
4. Koury, S.T., Bondurant, M.C., Koury, M.J. *Localization of Erythropoietin Synthesizing Cells in Murine Kidney by in-situ Hybridization.* **Blood** 1988; 71: 524-527.
5. Goldberg, M.A., Dunning, S.P., Bunn, H.F. *Regulation of the Erythropoietin Gene: Evidence that the Oxygen Sensor is a Heme Protein.* **Science** 1988; 242: 1412-1415.
6. Erslev, A.J., Caro, J., Birgegard, G., Silver, R., Miller, O. *The Biogenesis of Erythropoietin.* **Experimental Hematology** 1980; Suppl 8: 1-13.
7. Spivak, J.L. *The Mechanism of Action of Erythropoietin.* **Int J Cell Cloning** 1986; 4: 139-166.
8. Erslev, A.J. *Erythropoietin.* **New Eng J Med** 1991; 324:1339-1344.
9. Garcia, J.F., Ebbbe, S.N., Hollander, L., Cutting, H.O., Miller, M.E., Cronkites, E.P. *Radioimmunoassay of Erythropoietin: Circulating Levels in Normal and Polycythemic Human Beings.* **J Lab Clin Med** 1982; 99: 624-635.
10. Wild, D., editor. **The Immunoassay Handbook**, Stockton Press, 1994, p. 428.
11. Wide L., Bengtsson C., Birgegard G. *Circadian Rhythm of Erythropoietin in Human Serum.* **Br J Haematol** 1989; 72: 85-90.
12. Cahan C., Decker M.J., Arnold J.L., Washington L.H., Veldhuis J.D., Goldwasser E., Strohl K.P. *Diurnal Variations in Serum Erythropoietin Levels in Healthy Subjects and Sleep Apnea Patients.* **J Appl Physiol** 1992; 72: 2112-7.
13. Goldwasser E. and Sherwood J.B. *Annotation, Radioimmunoassay of Erythropoietin.* **Br J Haematol** 1981; 48: 359-63.
14. Kricka L.J. *Human Anti-Animal Antibody Interferences in Immunological Assays.* **Clin Chem** 1999; 45: 942-956.
15. Cotes P.M. and Spivak J.L. *Erythropoietin in Health and Disease.* **Erythropoietin Molecular, Cellular and Clinical Biology**, Editors: Erslev A.J., Adamson J.W., Wschbach J.W., Winearls C.G. 1991; Chapter 11:184-207.
16. Jelkmann W. *Renal Erythropoietin: Properties and Production.* **Rev Physiol Biochem Pharmacol** 1986; 104: 139-215.
17. Cotes M.P. *Anomalies in Circulating Erythropoietin Levels.* **Annals of NY Acad, Sci** 1994; 718:103-9.
18. **Wintrobe's Clinical Hematology**, ninth edition, edited by Lee G.R., Bithell T.C., Foerster J., Athens J.W., Lukens J.N. Lea & Febiger, Philadelphia 1993.
19. Fairbanks V. *Q & A.* **CAP Today** Nov 1996, pg. 88.
20. Spivak, J.L. **"Erythrocytosis", Hematology: Basic Principles and Practice**; editors: Hoffman R, Benz EJ Jr., Shattil, SJ; Furie B., Cohen HJ; Silberstein LE; 1995; Chapter 37:484-491
21. Miller, ME, Chandra M, Garcia JF: "Clinical applications of measurement of serum immunoreactive levels of erythropoietin", *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 459: 375-381, 1985.

## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità