

IMMULITE®

EPO

For use on the IMMULITE®
and IMMULITE® 1000 systems

DPC®

IMMULITE® / IMMULITE® 1000 EPO

English

Intended Use: For *in vitro* diagnostic use with the IMMULITE and IMMULITE 1000 Analyzers — for the quantitative measurement of erythropoietin (EPO) in serum or heparinized plasma, as an aid in the diagnosis of anemias and polycythemias.

Catalog Number: **LKEPZ** (50 tests), **LKEP1** (100 tests)

Test Code: **EPO** Color: **Light Green**

Summary and Explanation

Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein hormone consisting of 165 amino acids, with four complex carbohydrate chains attached to the peptide at four linkage sites.¹ It has a molecular weight of 36,000 daltons, 40% of this attributed to the carbohydrate chains. EPO is the primary regulator of erythropoiesis, stimulating the proliferation and differentiation of erythroid precursor cells in bone marrow. In mammals, the fetal liver produces nearly all of the hormone; in adults, hepatic production drops to under 10% and renal secretion accounts for over 90%.^{2,3} The production site is believed to be the proximal renal tubular cells or the peritubular capillary endothelial cells of the renal cortex and outer medulla. The clearance of circulating EPO has not been fully explained, but it is accomplished, in small part, by urinary excretion, and possibly also by hepatic elimination and by uptake into target cells in bone marrow.

EPO adjusts red blood cell production to meet the tissue oxygen demand.¹ It exerts its effect in a complex feedback system, in which renal secretion of the hormone is controlled by an oxygen sensor in the kidney that responds to the partial pressure of oxygen in blood. Under conditions of increased peripheral oxygen, EPO levels diminish. This is seen after correction of hypoxia in healthy subjects (as in descent from a high elevation) and after hypertransfusion.

Anemias may be divided into two categories with respect to EPO levels in

blood: those that are primary to EPO levels and those that are secondary. Primary anemias are characterized by an increase of EPO in the blood to attempt to restore red blood cell production levels to normal. Examples of anemias in which EPO levels are elevated include iron deficiency anemia, reduction of blood flow to the kidney (as in blood loss) and hemoglobinopathies with increased affinity of hemoglobin for oxygen.¹ The EPO production rate is seen to increase exponentially with the decrease in available oxygen and with falling hematocrit in nonrenal anemias; in the latter, EPO levels 1,000 times normal have been reported.²

Anemia can be secondary to inflammation, rheumatoid arthritis, neoplasm, and chronic renal disease. The "secondary anemias" may, however, be at least partly attributable to underproduction of EPO.⁴

A failure to produce sufficient EPO accounts for the moderate to severe anemias observed in end-stage renal disease. Decreased EPO production is attributed to destruction of renal production sites; the renal oxygen sensor may also be affected. Levels of the hormone slightly exceed the reference range at most, and are inadequate to counter the blood loss due to dialysis, shortened red blood cell life, iron and folate deficiency, impaired iron transfer to erythroid progenitor cells, and other challenges faced by such patients. Anephric patients demonstrate especially low EPO levels. A few patients with chronic kidney failure, however, exhibit normal hematocrits or less serious anemia, and elevated EPO. Some of these patients have cystic kidneys or viral hepatitis; in the latter, increased EPO may have resulted from enhanced hepatic production.

Overproduction of red blood cells is called polycythemia. Polycythemias may also be divided into two categories depending on whether the condition is primary or secondary to EPO levels. In polycythemia vera, EPO levels are diminished, and erythropoiesis is primary to and independent of stimulation by EPO. Variation in EPO values can be as much

as tenfold for different patients with the same hematocrit.

Certain other conditions may be characterized by the loss of feedback control of oxygen concentration over EPO production, causing an increase in EPO levels.³ These include renal cell carcinomas, in which 2 percent of patients demonstrate erythrocytosis, and some benign renal lesions, such as single or multiple renal cysts, renal artery stenosis and microvascular abnormalities. In addition, approximately 10 percent of renal transplant patients develop erythrocytosis, sometimes from autologous diseased kidney.

Secondary polycythemia is characterized by elevated EPO levels which lead to increased red blood cell mass. This condition may result from a variety of factors, including defective hemoglobin, smoking, pulmonary fibrosis, cardiac disease, tumors, and kidney stones.⁵

When assaying EPO for the differential diagnosis of polycythemias, the possible overlap of values for secondary erythrocytosis or for polycythemia vera with those in the reference range must be considered.³

Principle of the Procedure

IMMULITE/IMMULITE 1000 EPO is a solid-phase, chemiluminescent immunometric assay.

Incubation Cycles: 2 x 30 minutes.

Specimen Collection

There are several reports of diurnal variation of erythropoietin in literature references.⁷⁻⁹ It is important to collect samples at a consistent time of day. Morning samples taken between 7:30 am and 12:00 noon have been recommended.

A variation in values may occur if the sample is not clotted at room temperature (15–28°C).

Because EDTA would have a significant effect on results, it should not be used as an anticoagulant.

The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Hemolyzed or grossly contaminated samples may give erroneous results.

Centrifuging serum samples before a complete clot forms may result in the presence of fibrin. To prevent erroneous results due to the presence of fibrin, ensure that complete clot formation has taken place prior to centrifugation of samples. Some samples, particularly those from patients receiving anticoagulant therapy, may require increased clotting time.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. IMMULITE/IMMULITE 1000 EPO has not been tested with all possible variations of tube types. Consult the section on Alternate Sample Types for details on tubes that have been tested.

Volume Required: 100 µL serum or heparinized plasma. (Sample cup must contain at least 250 µL more than the total volume required.)

Storage: 7 days at 2–8°C or 2 months at –20°C. Avoid repeated freeze/thaw cycles.

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C. Dispose of in accordance with applicable laws.

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

Chemiluminescent Substrate: Avoid contamination and exposure to direct sunlight. (See insert.)

Water: Use distilled or deionized water.

Materials Supplied

Components are a matched set. The barcode labels are needed for the assay.

EPO Test Units (LEP1)

Each barcode-labeled unit contains one bead coated with anti-ligand derived from streptavidin. Stable at 2–8°C until expiration date.

LKEPZ: 50 units. **LKEP1:** 100 units.

Allow the Test Unit bags to come to room temperature before opening. Open by cutting along the top edge, leaving the ziplock ridge intact. Reseal the bags to protect from moisture.

EPO Reagent Wedges (LEPA, LEPB)

With barcodes. **LEPA:** 7.5 mL ligand-labeled murine monoclonal anti-EPO antibody, with preservative. **LEPB:** 7.5 mL alkaline phosphatase conjugated to goat polyclonal anti-EPO antibody in a buffer, with preservative. Store capped and refrigerated: stable at 2–8°C until expiration date. Recommended usage is within 30 days after opening when stored as indicated.

LKEPZ: 1 set. **LKEP1:** 1 set.

EPO Adjustors (LEPL, LEPH)

Two vials (Low and High) containing lyophilized human recombinant EPO in a nonhuman serum matrix, with preservative. At least 30 minutes before use: Reconstitute each vial with **4.0 mL** distilled or deionized water. Mix by gentle swirling or inversion until the lyophilized material is fully dissolved. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution, or for 6 months (aliquotted) at –20°C.

LKEPZ: 1 set. **LKEP1:** 1 set.

Kit Components Supplied Separately

EPO Sample Diluent (LEPZ)

For the manual dilution of patient samples. One vial 25 mL EPO-free nonhuman serum matrix, with preservative. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or for 6 months (aliquotted) at –20°C.

LSUBX: Chemiluminescent Substrate

LPWS2: Probe Wash Module

LKPM: Probe Cleaning Kit

LCHx-y: Sample Cup Holders (barcoded)

LSCP: Sample Cups (disposable)

LSCC: Sample Cup Caps (optional)

LEPCM: Tri-level EPO Control Module

Also Required

Sample transfer pipets, distilled or deionized water, controls.

Assay Procedure

Note that for optimal performance, it is important to perform all routine maintenance procedures as defined in the IMMULITE or IMMULITE 1000 Operator's Manual.

See the IMMULITE or IMMULITE 1000 Operator's Manual for: preparation, setup, dilutions, adjustment, assay and quality control procedures.

Visually inspect each Test Unit for the presence of a bead before loading it onto the system.

Note that both Reagent Wedges A and B must be loaded on the carousel to run this assay.

Each Sample cup holder can be followed by up to four test units.

Recommended Adjustment Interval:

2 weeks.

Quality Control Samples: Use controls or sample pools with at least two levels (low and high) of EPO.

Expected Values

A study performed with IMMULITE EPO on 167 apparently healthy laboratory volunteers yielded a median of 10.5 mIU/mL, a 95th percentile of 20.1 mIU/mL and an absolute range of 3.7 to 29.5 mIU/mL.

Caution should be exercised in interpreting the EPO results for patients with diseases other than anemia. 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.

Consider these limits as *guidelines* only. Each laboratory should establish its own reference ranges.

Limitations

Variations in EPO results have been seen in the presence of anti-species antibodies.

No drugs have been tested for assay interference.

The results of this assay should be used in conjunction with information available from clinical evaluations and other diagnostic procedures.

Because results obtained with any EPO assay may differ significantly from any other, it is recommended that any serial testing performed on the same patient over time should be performed with the same EPO test.

Lower EPO levels than expected have been seen with anemias associated with the following conditions: rheumatoid arthritis, acquired immunodeficiency syndrome, cancer, ulcerative colitis, sickle cell disease, and in premature neonates.

After allogeneic bone marrow transplant, impaired erythropoietin response may delay erythropoietin recovery.

Patients with hypergammaglobulinemia associated with multiple myeloma or Waldenstrom's disease have impaired production of erythropoietin in relation to hemoglobin concentration, and this has been linked to increased plasma viscosity.

EPO levels of persons living at high altitudes with erythrocytosis may rapidly fall to normal after returning to low altitudes.

Heterophilic antibodies in human serum can react with the immunoglobulins included in the assay components causing interference with *in vitro* immunoassays. [See Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Samples from patients routinely exposed to animals or animal serum products can demonstrate this type of interference potentially causing an anomalous result. These reagents have been formulated to minimize the risk of interference; however, potential interactions between rare sera and test components can occur. For diagnostic

purposes, the results obtained from this assay should always be used in combination with the clinical examination, patient medical history, and other findings.

Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the assay's performance. Results are expressed in mIU/mL.

Calibration Range: Up to 200 mIU/mL (WHO 2nd IRP 67/343).

Analytical Sensitivity: 1.0 mIU/mL

High-dose Hook Effect:

None up to 50,000 mIU/mL.

Precision: Samples were assayed in duplicate over the course of 20 days, two runs per day, for a total of 40 runs and 80 replicates. (See "Precision" table.)

Linearity: Samples were assayed under various dilutions. (See "Linearity" table for representative data.)

Recovery: Samples spiked 1 to 19 with two EPO solutions (85 and 777 mIU/mL) were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

Specificity: The assay is highly specific for EPO (see "Specificity" table).

Alternate Sample Type: Samples ($n = 22$) were collected into plain, heparinized and EDTA vacutainer tubes.

Concentration range: approximately 5.1 to 196 mIU/mL. EDTA plasma is not recommended for use.

(Heparin) = 0.99 (Serum) + 0.7 mIU/mL
 $r = 0.997$

(EDTA) = 0.88 (Serum) - 3.4 mIU/mL
 $r = 0.991$

Means:

77.7 mIU/mL (Serum)
77.6 mIU/mL (Heparin)
64.7 mIU/mL (EDTA)

Because EDTA would have a significant effect on results, it should not be used as an anticoagulant.

Bilirubin: Presence of conjugated and unconjugated bilirubin in concentrations up to 200 mg/L has no effect on results, within the precision of the assay.

Hemolysis: Presence of hemoglobin in concentrations up to 384 mg/dL may cause a depression of values. (See "Hemolysis" table.)

Lipemia: Presence of triglycerides in concentrations up to 3,000 mg/dL has no effect on results, within the precision of the assay.

Method Comparison: The assay was compared to a commercially available immunoradiometric assay for EPO (Kit A) on 130 endogenous serum samples. (Concentration range: approximately 2.5 to 200 mIU/mL. See graph.) By linear regression:

$$(IML) = 0.85 (\text{Kit A}) + 3.8 \text{ mIU/mL}$$

$$r = 0.978$$

Means:
41 mIU/mL (IMMULITE)
44 mIU/mL (Kit A)

References

1) Eckardt KU, Bauer C. Erythropoietin in health and disease. *Europ J Clin Invest* 1989;19:117-27. 2) Eschbach J, Adamson J. Recombinant human erythropoietin: implications for nephrology. *Am J Kidney Dis* 1988;11:203-9. 3) Koch KM, Kuhn K, Nonnast-Daniel B, Scigalla P, volume editors. Treatment of renal anemia with recombinant human erythropoietin. In: Berlyne GM, Giovannetti S, series editors. *Contributions to Nephrology*. New York: Karger, 1988; 66:1-15 and 54-61. 4) Mengel et al. *Hematology: principles and practice*. Chicago: Year Book Medical Publishers Inc., 1973. 5) Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Wilson JD, Martin JB, Fanci AS, editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 11th ed. New York: McGraw-Hill, 1987:149,1599. 6) Raine AEG. Hypertension, blood viscosity, and cardiovascular morbidity in renal failure: implications of erythropoietin therapy. *Lancet* 1988;1:97-9. 7) Miller ME, Garcia JF, Cohen RA, Cronkite EP, Moccia G, Acevado J. Diurnal levels of immunoreactive erythropoietin in normal subjects and subjects with chronic lung disease. *Br J Haematol* 1981;49:189-200. 8) Wide L, Bengtsson C, Birgegard G. Circadian Rhythm of erythropoietin in human serum. *Br J Haematol* 1989;72:85-90. 9) Cahan C, Decker MJ, Arnold JL, Washington LH, Veldhuis JD, Goldwasser E, Strohl DP. Diurnal Variations in serum erythropoietin levels in healthy subjects and sleep apnea patients. *J Appl Physiol* 1992;72:2112-7. 10) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved standard. 4th ed. NCCLS Document H3-A4, Wayne, PA: NCCLS, 1998.

Technical Assistance

In the United States, contact DPC's Technical Services department.
Tel: 800.372.1782 or 973.927.2828

Fax: 973.927.4101. Outside the United States, contact your National Distributor.

Manufactured by EURO/DPC Ltd. under a Quality System registered to ISO 13485:2003.

Tables and Graphs

Precision (mIU/mL)

	Mean ³	Within-Run ¹	Total ²
		CV ⁴	CV
1	6.8	6.3%	6.1%
2	18	8.1%	8.6%
3	37	7.2%	7.5%
4	72	6.3%	6.6%
5	148	5.1%	5.4%

Linearity (mIU/mL)

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	8 in 8 ⁵	92.5	—	—
	4 in 8	46.7	46.3	101%
	2 in 8	23.4	23.1	101%
	1 in 8	12.0	11.6	104%
2	8 in 8	149	—	—
	4 in 8	70.6	74.5	95%
	2 in 8	35.3	37.3	95%
	1 in 8	18.1	18.6	97%
3	16 in 16	174	—	—
	8 in 16	89.9	87.0	103%
	4 in 16	48.4	43.5	111%
	2 in 16	22.1	21.8	102%
	1 in 16	11.8	10.9	109%
4	8 in 8	181	—	—
	4 in 8	87.3	90.5	96%
	2 in 8	43.1	45.3	95%
	1 in 8	21.8	22.6	96%
5	4 in 4	186	—	—
	2 in 4	95.6	93.0	103%
	1 in 4	48.5	46.5	104%

Recovery (mIU/mL)

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	—	24	—	—
	A	30	27	111%
	B	65	62	105%
2	—	46	—	—
	A	43	48	90%
	B	83	83	100%
3	—	71	—	—
	A	70	72	97%
	B	110	106	104%
4	—	136	—	—
	A	139	133	105%
	B	175	168	104%

Specificity

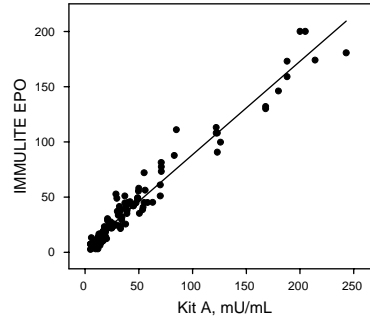
Compound ¹	Added ² (µg/mL)	Apparent Conc. EPO ³ mIU/mL	% Cross- reactivity ³
EPO	—	—	100%
α-2-Macroglobulin	600	ND	ND
γ-Globulin	60,000	ND	ND
Human Serum Albumin	60,000	ND	ND
Human Anti-Trypsin	100	ND	ND
α-Acid Glycoprotein	100	ND	ND
Human α-Globulin	100	ND	ND
Human Transferrin (iron-saturated)	100	ND	ND
Human Transferrin (nonsaturated)	100	ND	ND

ND: not detectable.⁵

Hemolysis

	Unspiked ¹	128 mg/dL	192 mg/dL	384 mg/dL
1	26	24	22	22
2	48	43	41	37
3	49	43	44	42
4	72	70	66	54
5	125	124	107	118
6	146	149	158	137

Method Comparison



$$(IML) = 0.85 (\text{Kit A}) + 3.8 \text{ mIU/mL}$$

$$r = 0.978$$

Deutsch. Precision: ¹Intra-Assay, ²Gesamt, ³Mittelwert, ⁴CV (Variationskoeffizient).

Linearity: ¹Verdünnung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Probe, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E.

Specificity: ¹Verbindung, ²zusetzte Menge, ³Gemessene Konzentration, ⁴% Kreuzreaktivität, ⁵NN: Nicht nachweisbar. **Bilirubin:** ¹ohne Zugabe. **Hemolysis:** ¹ohne Zugabe.

Español. Precision: ¹Intraensayo, ²Total, ³Media, ⁴CV. **Linearity:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵8 en 8. **Recovery:** ¹Solución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Compuesto, ²Cantidad añadida, ³Concentración aparente, ⁴% Reacción cruzada, ⁵ND: no detectable. **Bilirubin:** ¹Sin añadir. **Hemolysis:** ¹Sin añadir.

Français. Precision: ¹Intraessai, ²Total, ³Moyenne, ⁴CV. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A, ⁵8 dans 8. **Recovery:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A.

Specificity: ¹Composé, ²ajouté, ³Concentration apparente, ⁴Réaction croisée%. ⁵ND: non détectable. **Bilirubin:** ¹Non chargés. **Hemolysis:** ¹Non chargés.

Italiano. Precision: ¹Intra-serie, ²Totale, ³Media, ⁴CV (Coefficiente di Variazione). **Linearity:** ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composto,

²quantità aggiunta, ³Concentrazione apparente, ⁴Percentuale di Crossreattività, ⁵ND: non determinabile. **Bilirubin:** ¹Semplice, senza aggiunte. **Hemolysis:** ¹Semplice, senza aggiunte.

Português. Precision: ¹Entre-ensaios, ²Total, ³Média, ⁴Coeficiente de variação. **Linearity:** ¹Diluição, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵8 em 8. **Recovery:** ¹Solução, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Composto, ²Quantidade adicionada, ³Apparent Concentration, ⁴Percentagem de reação cruzada, ⁵ND: não detectável. **Bilirubin:** ¹Não adicionada. **Hemolysis:** ¹Não adicionada.

Deutsch

IMMULITE EPO

Anwendung: Zur *in vitro*-Diagnostik unter Verwendung der IMMULITE und IMMULITE 1000 Systeme – für die quantitative Bestimmung von Erythropoietin (EPO) im Serum oder Heparin-Plasma, als Hilfestellung bei der Diagnose einer Anämie und Polyzythämie.

Artikelnummern:

LKEPZ (50 Tests)

LKEP1 (100 Tests)

Testcode: **EPO** Farbe: **hellgrün**

Klinische Relevanz

Das Erythropoietin (EPO) ist ein mit komplexen Kohlenhydratketten glykosyliertes Protein mit 165 Aminosäuren.¹ Es hat ein Molekulargewicht von 36 kDa mit einem Kohlenhydratanteil von 40%. Das EPO ist ein wichtiger Faktor in der Proliferation und Differenzierung der Erythrozytenvorläuferzellen im Knochenmark. Bei Säugetieren wird der Grossteil des fetalen EPO in der Leber produziert, während bei Erwachsenen 90% der Synthese in der Niere erfolgt.^{2,3} In der Leber wird dann noch etwa 10% produziert. Der EPO Abbau ist noch nicht vollständig geklärt. Ein kleiner Teil wird über den Urin ausgeschieden, weiterhin erfolgt der Abbau wahrscheinlich in der Leber und über die Aufnahmen in die Zielzellen im Knochenmark.

Das EPO reguliert abhängig vom Sauerstoffbedarf des Gewebes die

Synthese der roten Blutzellen.¹ Die Regulation erfolgt über einen komplexen Feedbackmechanismus, bei dem über einen Sauerstoffsensoren der Niere der Sauerstoffpartialdruck im Blut die Sekretion des Hormons steuert. Eine erhöhte Sauerstoffkonzentration führt zu einer Erniedrigung der EPO-Konzentration. Diese Beobachtung wird bei der erfolgreichen Therapie der Hypoxie Gesunder (nach vorheriger starker Erhöhung der EPO-Spiegel) und Hypertransfusion gemacht.

Anhand der EPO-Spiegel im Blut werden die Anämien in zwei Gruppen unterteilt. In primäre und sekundäre. Bei primären Anämien kommt es zu einem Anstieg der EPO-Konzentration, um die Synthese roter Blutzellen sicherzustellen. Beispiele für Anämien bei denen erhöhte EPO-Spiegel gefunden werden sind: Eisenmangelanämien, erniedrigte Blutzirkulation der Leber (nach Blutverlust) und Hämoglobinpathologien mit einer erhöhten Sauerstoffbindungskapazität des Hämoglobins.¹ Bei Anämien nicht renalen Ursprungs steigt anscheinend die EPO-Synthese proportional zu Abnahme der Sauerstoffkonzentration und dem abfallenden Hämatokrit. In diesen Fällen wurden bis zu 1 000fach erhöhte Werte gefunden.²

Sekundäre Anämien werden in Zusammenhang mit Entzündungen, rheumatoider Arthritis, Neoplasien und chronischen Nierenerkrankung beobachtet. Verantwortlich für diese sekundären Anämien ist unter anderem eine zu geringe EPO-Synthese.⁴

Die Schwierigkeit, genügend EPO zu synthetisieren, führt zu verschiedenen stark ausgeprägten Anämien. Schwere Anämien werden bei Nierenerkrankungen im Endstadium beobachtet. Eine Ursache für die erniedrigte Syntheserate ist die Zerstörung des Gewebes in dem das EPO gebildet wird. Allerdings kann auch der Sauerstoffsensoren beeinflusst sein. EPO-Spiegel im unteren Referenzbereich sind nicht ausreichend, um den Blutverlust während der Dialyse zu ersetzen. Die Folgen für die Patienten sind unter anderem: verkürzte Lebenszeit der roten Blutzellen, Eisen- und Folsäuremangel und ein verschlechterter Eisentransport zu der Erythrozytenvorläuferzellen. Besonders Patienten mit eingeschränkter

Nierenfunktion zeigen erniedrigte EPO-Spiegel. Dennoch zeigen einige Patienten mit chronischem Nierenversagen normale Hämatokritwerte oder weniger schwerwiegende Anämien und erhöhte EPO-Spiegel. Einige dieser Patienten haben zystische Nieren oder eine virale Hepatitis. Die Ursache der erhöhten EPO-Spiegel bei der zuletzt genannten Patientengruppe ist die gesteigerte Produktion in der Leber.

Die pathologisch erhöhte Synthese roter Blutzellen wird als Polycythaemie bezeichnet. Sie wird in Bezug auf die EPO-Spiegel in zwei Gruppen (primäre und sekundäre) unterteilt. Bei der Polycythaemia vera erfolgt die Erythropoese unabhängig vom EPO. Es werden erniedrigte EPO-Konzentrationen bestimmt.

Bei Patienten mit gleichem Hämatokritwert kann der EPO-Spiegel um einen Faktor zehn variieren. Auch bei anderen Erkrankungen kann die Feedback-Regulation der EPO-Konzentration durch die Sauerstoffmenge verloren gehen, was zu einem erhöhten EPO-Spiegel führt.³ Dazu zählen Nierenzellkarzinome, bei welchen 2% der Patienten eine Erythrozytose zeigen, einige benigne Nierenerkrankungen wie Zysten, Stenosen der Nierenarterien und mikrovaskuläre Abnormalitäten. Zusätzlich zeigen ungefähr 10% der Patienten einer Nierentransplantation eine Erythrozytose.

Die sekundäre Polycythaemie ist durch einen erhöhten EPO-Spiegel sowie eine erhöhte Menge an roten Blutzellen gekennzeichnet. Die Ursache können folgende Faktoren sein: defektes Hämoglobin, Lungenfibrose, kardiale Erkrankungen, Tumore und Nierensteine.⁵

Bei der Bestimmung der EPO-Konzentration zur Differentialdiagnose der Polycythaemie muss die Überschneidung der Werte für die Erythrozytose oder für die Polycythaemia vera mit dem Referenzbereich beachtet werden.³

Methodik

IMMULITE/IMMULITE 1000 EPO ist ein Festphasen, Chemilumineszenz immunometrischer Assay.

Inkubationszyklen: 2 x 30 min.

Probengewinnung

Es gibt mehrere Berichte in der Literatur über tageszeitliche Schwankungen bei Erythropoietin.⁷⁻⁹ Es ist wichtig, die Proben jeweils zu einem festgesetzten Zeitpunkt abzunehmen. Es wird empfohlen, die Proben morgens zwischen 7:30 und mittags 12:00 zu gewinnen.

Schwankungen in den Werten können auftreten, sofern die Proben nicht bei Raumtemperatur (15–28°C) gerinnen konnten.

EDTA würde die Resultate erheblich verfälschen und sollte daher nicht als Antikoagulans verwendet werden.

Der Einsatz einer Ultrazentrifuge wird zur Klärung von lipämischen Proben empfohlen.

Hämolytische oder grob kontaminierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

Die Zentrifugation der Serumproben vor dem völligen Abschluss der Gerinnung kann zu Fibringerinnungen führen. Um fehlerhaften Analyseergebnissen infolge von Gerinnseln vorzubeugen, ist sicherzustellen, dass die Gerinnung vor der Zentrifugation der Proben vollständig abgeschlossen ist. Insbesondere Proben von Patienten unter Antikoagulantien-therapie können eine verlängerte Gerinnungszeit aufweisen.

Blutentnahmeröhrchen von verschiedenen Herstellern können differierende Werte verursachen. Dies hängt von den verwendeten Materialien und Additiven (Gel oder physische Trennbarrieren, Gerinnungsaktivatoren und /oder Antikoagulantien) ab.

IMMULITE/IMMULITE 1000 EPO sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden. Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

Erforderliche Menge: 100 µl Serum oder Heparin-Plasma. (Inhalt der Probenschale muss mindestens 250 µl über der erforderlichen Gesamtmenge liegen.)

Lagerung: 7 Tage bei 2–8°C haltbar oder 2 Monate bei –20°C. Wiederholtes Einfrieren/Auftauen vermeiden.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Bei 2–8°C lagern. Unter Einhaltung der geltenden gesetzlichen Vorschriften entsorgen.

Die generell geltenden Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten und alle Komponenten als potenziell infektiös zu behandeln. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wurden auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper untersucht und negativ befundet.

Bestimmten Komponenten wurde Natriumazid (<0,1 g/dl) hinzugefügt. Um die Bildung von explosiven Metallaziden in Blei- und Kupferrohren zu vermeiden, sollten die Reagenzien nur zusammen mit großen Wassermengen in die Kanalisation gespült werden.

Chemilumineszenz-Substrat: Kontamination und direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. Siehe Packungsbeilage.

Wasser: Destilliertes oder deionisiertes Wasser verwenden.

Im Lieferumfang enthalten

Die Komponenten sind aufeinander abgestimmt. Die Barcode-Etiketten werden für den Assay benötigt.

EPO-Testeinheiten (LEP1)

Jede mit Barcode-Etikette versehene Einheit enthält eine mit Anti-ligand (Streptavidin-Derivat) beschichtete Kugel. Bei 2–8°C bis zum Ablaufdatum haltbar.

LKEPZ: 50 Testeinheiten.

LKEP1: 100 Testeinheiten.

Verpackte Testeinheiten vor dem Öffnen stehen lassen, bis sie Zimmertemperatur erreicht haben. Oben entlang der Kante aufschneiden, ohne den Plastikverschluss zu beschädigen. Verpackungen wieder dicht verschließen, damit der Inhalt trocken bleibt.

EPO-Reagenzbehälter (LEPA)

Mit Barcode. **LEPA:** 7,5 ml ligandmarkierte monoklonale anti-EPO-Mausantikörper (mit Konservierungsmittel). **LEPB:** 7,5 ml

mit alkalischer Phosphatase (Rinderkalbsdarm) konjugierte polyklonale anti-EPO-Ziegenantikörper in Pufferlösung (mit Konservierungsmittel). Verschlossen und gekühlt aufbewahren: Bei 2–8°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Bei entsprechender Lagerung beträgt die empfohlene Verbrauchsfrist nach dem Öffnen 30 Tage.

LKEPZ: 1 Set. **LKEP1:** 1 Set.

EPO-Kalibratoren (LEPL, LEPH)

Zwei Fläschchen (niedrig und hoch) mit lyophilisiertem human rekombinanten EPO in nichthumaner Serummatrix. (mit Konservierungsmittel). Mindestens 30 min. vor dem Gebrauch: Fläschchen mit je **4,0 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren. Zum Mischen leicht schwenken oder umdrehen, bis das lyophilisierte Material vollständig aufgelöst ist. Nach Rekonstituierung 30 Tage bei 2–8°C, sonst 6 Monate (aliquotiert) bei –20°C haltbar.

LKEPZ: 1 Set. **LKEP1:** 1 Set.

Separat erhältliche Testsystem-Komponenten

EPO Verdünnungspuffer (LEPZ)

Zur manuellen Verdünnung von Patientenproben. Ein Fläschchen (25 ml) EPO-freie nichthumane Serummatrix (mit Konservierungsmittel). 30 Tage nach dem Öffnen bei 2–8°C haltbar oder 6 Monate bei –20°C (aliquotiert).

LSUBX: Chemilumineszenz-Substrat

LPWS2: Pipettenwaschlösung

LKPM: Pipettenreinigungsset

LCHx-y: Halterungen für die Probenschalen (mit Barcodierung)

LSCP: Probenschalen (Einwegartikel)

LSCC: Verschlüsse für die Probenschalen (optional)

LEPCM: EPO Kontrollmodul in drei Konzentrationen.

Ebenfalls benötigt

Transferpipetten für die Proben;
destilliertes bzw. deionisiertes Wasser;
Kontrollen.

Testdurchführung

Für eine optimale Funktion des Gerätes ist unbedingt zu beachten, dass die Wartungen, wie im IMMULITE oder

IMMULITE 1000-Handbuch beschrieben, regelmäßig durchgeführt werden.

Das Handbuch für das IMMULITE bzw. IMMULITE 1000 enthält die Anweisungen für: Vorbereitung, Geräteeinstellungen, Verdünnungen, Kalibrierung, Testdurchführung und Qualitätskontrollen.

Überprüfen Sie jede Testeinheit auf das Vorhandensein der Polystyrol-Kugel vor dem Einsetzen in das Gerät.

Beachten Sie, dass zur Durchführung dieses Tests beide Reagenzbehälter (A und B) auf das Karussell geladen werden müssen.

Hinter jedem Probenaufnahmegefäß können bis zu 4 Testeinheiten nachfolgen.

Empfohlenes Kalibrationsintervall:
2 Wochen.

Proben zur Qualitätskontrolle:
Kontrollen oder Poolseren mit EPO in mindestens zwei Konzentrationen (niedrig und hoch) verwenden.

Referenzwerte

Eine Studie des Herstellers mit dem IMMULITE EPO mit 167 gesunden Laborfreiwilligen zeigte einen Median von 10,5 mIU/ml, eine 95% Perzentile von 20,1 mIU/ml und einen Absolutbereich von 3,7 mIU/ml bis 29,5 mIU/ml.

Bei der Interpretation von EPO-Werten von Patienten mit nicht anämischen Erkrankungen ist besondere Vorsicht geboten. Bei Patienten mit Eryzytose, bedingt durch nicht-kompensierte Hypoxie ist immunreaktives Serum-EPO erhöht; bei solchen mit kompensierter Hypoxie ist der Serumspiegel des Immunreaktiven EPO gewöhnlich im Normalbereich, bei Patienten mit Polycythaemia vera ist der EPO Spiegel normal oder erniedrigt. Während erhöhte Serum-EPO-Spiegel erklären, dass es sich bei einer Erythrozytose um ein sekundäres Phänomen handelt und ein niedriger EPO-Spiegel die Möglichkeit einer autonomen Erythropoese einräumt, schließt ein normaler EPO Serumspiegel weder eine Hypoxie noch eine autonome EPO-Produktion als Grund für eine Erythrozytose aus.

Diese Grenzwerte sind lediglich als *Richtlinien* aufzufassen. Jedes Labor

sollte seine eigenen Referenzbereiche etablieren.

Grenzen der Methode

Bei Vorliegen von Antikörpern gegen andere Spezies wurden Schwankungen bei den EPO Werten festgestellt.

Beinflussungen des Tests durch Arzneimittel wurden nicht überprüft.

Die Ergebnisse dieses Tests sollten immer in Verbindung mit klinischen Informationen und anderen diagnostischen Verfahren bewertet werden.

Da sich die Ergebnisse verschiedener EPO Testverfahren sich signifikant voneinander unterscheiden können, wird empfohlen, serielle Untersuchungen eines Patienten über einen bestimmten Zeitraum immer mit dem gleichen EPO Test durchzuführen.

Bei Anämien bedingt durch die nachfolgend aufgeführten Erkrankungen wurden erniedrigte Werte beobachtet: Rheumatoide Arthritis, AIDS, Tumorerkrankungen, Colitis ulcerosa, Sichelzellanämie, Frühgeborene.

Nach allogener Knochenmarkstransplantation kann ein beeinträchtigter Erythropoietin-Response das Wiederauftreten von Erythropoietin verzögern.

Patienten mit Hypergammaglobulinämie verbunden mit multiplen Myelom oder Morbus Waldenström haben eine beeinträchtigte Erythropoietin-Produktion in Relation zur ihrer Hämoglobinkonzentration. Dies ist mit einer erhöhten Plasma-Viskosität verknüpft.

In großer Höhe lebende Personen mit Erythrocytose können nach Rückkehr in gemäßigten Höhenlagen schnell zum Normalzustand zurückfinden.

Heterophile Antikörper in Humansenen können mit Immunglobulinen aus den Assaykomponenten reagieren und Interferenzerscheinungen innerhalb des in vitro Immunoassays verursachen. (Clin. Chem. 1988;34:27-33) Proben von Patienten, die häufig mit Tier- bzw. Tierserumprodukten zu tun haben, können die erwähnten Interferenzen verursachen und zu anomalen Resultaten führen. Die verwendeten Reagenzien sind so

konzipiert, dass das Risiko einer Interferenz mit den zu messenden Proben minimiert ist. Dennoch können potentiell Interaktionen zwischen seltenen Seren und den Testkomponenten auftreten. Zu diagnostischen Zwecken sollten die mit dem Assay erhaltenen Ergebnisse immer in Kombination mit der klinischen Untersuchung, der Patientenanamnese und anderen Befunden gesehen werden.

Leistungsdaten

Siehe Tabellen und Grafiken mit *repräsentativen* Daten für den Assay. Die Ergebnisse sind als mIU/mL ausgedrückt.

Messbereich: Bis 200 mIU/ml (WHO 2nd IRP 67/343).

Analytische Sensitivität: 1,0 mIU/ml.

High-Dose-Hook-Effect:
Bis 50 000 mIU/ml keiner.

Präzision: Proben wurden innerhalb von 20 Tagen mit jeweils zwei Testansätzen in Doppelbestimmung gemessen (insgesamt 40 Bestimmungen und 80 Einzelmessungen; siehe Tabelle „Präzision“).

Linearität: Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Linearität“.)

Wiederfindung: Die getesteten Proben waren mit zwei EPO-Lösungen (85 und 777 mIU/ml) 1:19 versetzt. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Recovery“.)

Spezifität: Hochspezifischer Anti-EPO-Antikörper (siehe Tabelle „Spezifität“).

Alternativer Probentyp: Die Proben wurden in unbehandelte, heparinisierte und EDTA-behandelte Vacutainer-Röhrchen gefüllt. Konzentrationsbereich ca. 5,1–196 mIU/ml. Die Verwendung von EDTA-Plasma ist nicht empfehlenswert.

(Heparin) = 0,99 (Serum) + 0,7 mIU/ml
 $r = 0,997$

(EDTA) = 0,88 (Serum) – 3,4 mIU/ml
 $r = 0,991$

Mittelwert:
77,7 mIU/ml (Serum)
77,6 mIU/ml (Heparin)
64,7 mIU/ml (EDTA)

EDTA würde die Resultate erheblich verfälschen und sollte daher nicht als Antikoagulans verwendet werden.

Bilirubin: Konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin hat in Konzentrationen bis zu 200 mg/l keinen Einfluss auf die Messung, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Hämolyse: Hemoglobin in Konzentrationen bis zu 384 mg/dl kann zu einer Erniedrigung der Werte führen (Siehe Tabelle „Hemolysis“).

Lipämie: Triglyceride haben in Konzentrationen bis zu 3 000 mg/dl keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Methodenvergleich: Der Assay wurde unter Verwendung von 130 endogenen Serumproben mit einem kommerziell erhältlichen immunoradiometrischen Assay (Kit A) für EPO verglichen. Konzentrationsbereich ca. 2,5–200 mIU/ml. Siehe Grafik.) Durch lineare Regression:

(IML) = 0,85 (Kit A) + 3,8 mIU/ml
 $r = 0,978$

Mittelwert:
41 mIU/mL (IMMULITE)
44 mIU/mL (Kit A)

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

Hergestellt von Euro/DPC Ltd. unter dem Qualitätssystem ISO 13485:2003.

Español

EPO

Utilidad del análisis: Para su uso en el diagnóstico *in vitro* con los analizadores IMMULITE e IMMULITE 1000 — para la medición cuantitativa de eritropoyetina (EPO) en suero o plasma heparinizado, como una ayuda en el diagnóstico de anemias y policitemias.

Números de Catálogo: **LKEPZ** (50 tests), **LKEP1** (100 tests)

Código del Test: **EPO Color: Verde claro**

Resumen y Explicación del Test

La eritropoyetina (EPO) es una hormona glucoproteica que consta de 165 aminoácidos, con cuatro cadenas de carbohidratos complejos unidas al péptido en cuatro puntos de anclaje.¹ Tiene un peso molecular de 36 000 daltons, 40% del cual se atribuye a las cadenas de carbohidratos. EPO es la reguladora primaria de la eritropoyesis; estimula la proliferación y diferenciación de células precursoras eritroides en la médula ósea. En los mamíferos, el hígado fetal produce casi todas las hormonas; en los adultos, la producción hepática cae por debajo del 10% y la secreción renal supone más del 90%.^{2,3} Se cree que el punto de producción son las células tubulares renales proximales o las células endoteliales capilares peritubulares de la corteza renal y de la médula exterior. El aclaramiento de EPO circulante no se ha explicado por completo pero se alcanza, en una pequeña parte, a través de la excreción urinaria y, probablemente, también por eliminación hepática y captura por parte de las células de destino en la médula ósea.

EPO ajusta la producción de eritrocitos para que satisfaga la demanda tisular de oxígeno.¹ Ejerce su efecto en un sistema de retroalimentación complejo, en el cual la secreción renal de la hormona está controlada por un sensor de oxígeno en el riñón, sensor que responde a la presión parcial de oxígeno en la sangre. En condiciones de aumento del oxígeno periférico, los niveles de EPO se reducen. Esto puede verse tras la corrección de la hipoxia en individuos sanos (por ejemplo tras descender de grandes alturas) y después de una hipertransfusión.

Las anemias pueden dividirse en dos categorías con respecto a los niveles de EPO en sangre: aquéllas que son primarias respecto a los niveles de EPO y aquéllas que son secundarias. Las anemias se caracterizan por un aumento de EPO en sangre para intentar restaurar la producción normal de células sanguíneas. Entre los ejemplos de anemias, en las cuales se elevan los niveles de EPO, se encuentran la anemia por deficiencia de hierro, la reducción de flujo sanguíneo al riñón (como ocurre en las pérdidas de sangre) y las

hemoglobinopatías con afinidad aumentada de la hemoglobina por el oxígeno.¹ Se ha observado que la tasa de producción de EPO aumenta exponencialmente con el descenso del oxígeno disponible, y con la caída del hematocrito en anemias no renales; en estas últimas se han observado niveles de EPO 1 000 veces mayores de los normales.²

La anemia puede ser secundaria respecto a la inflamación, artritis reumatoide, neoplasia y enfermedad renal crónica. Las "anemias secundarias" pueden sin embargo atribuirse, al menos en parte, a un déficit en la producción de EPO.⁴

La incapacidad para producir suficiente EPO es responsable de anemias de moderadas a graves, observadas en las etapas finales de enfermedades renales. La disminución en la producción de EPO se atribuye a la destrucción de los centros de producción renal; también puede verse afectado el sensor de oxígeno renal. Los niveles de hormona sólo pueden sobrepasar ligeramente el intervalo de referencia, y resultan inadecuados para contrarrestar la pérdida de sangre debida a la diálisis, al acortamiento de la vida de las células sanguíneas, a la deficiencia de hierro y folato, a dificultades en la transferencia de hierro a las células eritroides progenitoras y a otras dificultades que deben afrontar tales pacientes. Los pacientes anefríticos presentan niveles de EPO especialmente bajos. Unos pocos pacientes con insuficiencia renal crónica exhiben hematocritos normales o anemias menos graves, y niveles elevados de EPO. Algunos de estos pacientes tienen riñones císticos o hepatitis viral; en este último caso, los niveles elevados de EPO pueden ser resultado de un aumento de la producción hepática.

La superproducción de eritrocitos se denomina policitemia. Las policitemias se dividen también en dos categorías, dependiendo de si la condición es primaria o secundaria respecto a los niveles de EPO. En la policitemia vera, los niveles de EPO se reducen y la eritropoyesis es primaria e independiente de la estimulación por EPO. La variación de los valores de EPO puede ser de hasta diez veces para diferentes pacientes con el mismo hematocrito.

Algunas condiciones pueden caracterizarse por la pérdida del control por retroalimentación del nivel de oxígeno sobre la producción de EPO, lo que provoca un aumento de los niveles de EP.³ Entre ellas se incluyen los carcinomas celulares renales, en los cuales el 2 por ciento de los pacientes presentan eritrocitosis y algunas lesiones renales benignas, tales como quistes renales sencillos o múltiples, estenosis arterial renal y anomalías microvasculares. Además, aproximadamente un 10 por ciento de los pacientes con trasplantes renales desarrollan eritrocitosis, a veces a partir de un riñón autodañado.

La policitemia secundaria se caracteriza por elevados niveles de EPO, que conducen al aumento de la cantidad de eritrocitos. Esta condición puede estar provocada por diversos factores, entre los que se incluyen la hemoglobina defectuosa, el consumo de tabaco, la fibrosis pulmonar, enfermedades cardíacas, tumores y cálculos renales.⁵

Cuando se examina la EPO para el diagnóstico diferencial de policitemias, debe considerarse la posibilidad de solapamiento entre los valores para eritrocitosis secundaria o policitemia vera y los valores del intervalo de referencia.³

Principio del análisis

IMMULITE/IMMULITE 1000 EPO es un ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida.

Ciclos de incubación: 2 x 30 minutos.

Recogida de la muestra

Hay varios informes de variaciones diurnas de eritropoyetina en las referencias de la literatura.⁷⁻⁹ Es importante recoger siempre las muestras a la misma hora del día. Es recomendable tomar las muestras matutinas entre las 7:30 a.m y las 12:00 del mediodía.

Puede darse una variación de los valores si la muestra no se coagula a temperatura ambiente (15 a 28°C).

Como EDTA tendría un efecto significativo en los resultados, no debe usarse como anticoagulante.

Se recomienda el uso de una ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas.

Las muestras hemolizadas o ampliamente contaminadas pueden dar resultados erróneos.

La centrifugación de las muestras de suero antes de que se forme el coágulo puede ocasionar la presencia de fibrina. Para evitar resultados erróneos debidos a la presencia de fibrina, asegurarse que se ha formado el coágulo completamente antes de centrifugar las muestras. Algunas muestras, particularmente aquellas de pacientes sometidos a terapia anticoagulante, pueden requerir mayor tiempo de coagulación.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel o barreras físicas, activadores de la coagulación y/o anticoagulantes. El EPO IMMULITE/IMMULITE 1000 no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos. Para obtener detalles sobre los tipos tubos que se han analizado, consulte la sección de Tipos de Muestras Alternativas.

Volumen requerido: 100 µl suero y plasma heparinizado. (El recipiente de la muestra debe contener, como mínimo, 250 µl más que el volumen total requerido).

Conservación: 7 días a 2–8°C, o 2 meses a –20°C. Evitar las congelaciones y descongelaciones repetidas.

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Mantener a 2–8°C. Desechar de acuerdo con las normas aplicables.

Siga las precauciones universales y manipule todos los componentes como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Los materiales derivados de sangre humana han sido analizados y son negativos para sífilis; para anticuerpos frente al HIV 1 y 2; para el antígeno de superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

Se ha usado Azida sodica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminacion, lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitucion de residuos de azidas metalicas, potencialmente explosivas, en las cañerias de cobre y plomo.

Sustrato quimioluminiscente: evite la contaminación y exposición a la luz directa del sol. (Ver el prospecto.)

Agua: Use agua destilada o desionizada.

Materiales Suministrados

Los componentes representan un juego completo. Las etiquetas incluidas en la caja son necesarias para el ensayo.

Unidades de análisis de EPO (LEP1)

Cada unidad etiquetada con código de barras contiene una bola recubierta de anti-ligando derivado de estreptavidina. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad.

LKEPZ: 50 unidades.

LKEP1: 100 unidades.

Espere a que las bolsas de las unidades de análisis alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlas. Ábralas cortando por el extremo superior, dejando el borde del cierre de cremallera intacto. Vuelva a cerrar las bolsas herméticamente para protegerlas de la humedad.

Viales de reactivos de EPO (LEPA, LEPB)

Con códigos de barras. **LEPA:** 7,5 ml anticuerpo monoclonal murino anti-EPO marcado con ligando, con conservante. **LEPB:** 7,5 ml fosfatasa alcalina conjugada con anticuerpo policlonal anti-EPO de cabra en solución tampón, con conservante. Guardar tapado y refrigerado: estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad. Se recomienda utilizarlo antes de que pasen 30 días después de abrirlo cuando se guarda según lo indicado.

LKEPZ: 1 juego. **LKEP1:** 1 juego.

Ajustadores de EPO (LEPL, LEPH)

Dos viales (bajo y alto) que contienen EPO humana recombinante liofilizada en una matriz de suero no humano, con conservante. 30 minutos, como mínimo,

antes de su uso: Reconstituya cada vial con **4,0 ml** de agua destilada o desionizada. Mezcle por agitación o inversión suave hasta que se haya disuelto completamente el material liofilizado. Estable a 2–8°C durante 30 días después de la reconstitución, o hasta 6 meses (aliquotados) a –20°C.

LKEPZ: 1 juego. **LKEP1:** 1 juego.

Componentes del kit que se suministran por separado

Diluyente de EPO (LEPZ)

Para la dilución manual de las muestras de los pacientes. Un vial (25 ml) de matriz de suero no humano, libre de EPO, con conservante. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrise, o hasta 6 meses (aliquotados) a –20°C.

LSUBX: Sustrato quimioluminiscente

LPWS2: Lavado de sonda

LKPM: Kit de limpieza de sonda

LCHx-y: Soportes de recipientes de muestras (con códigos de barras)

LSCP: Recipientes de muestras (desechables)

LSCC: Tapas para los recipientes de muestras (opcionales)

LEPCM: Módulo de control EPO de tres niveles

También necesario

Pipetas de transferencia de muestras; agua destilada o desionizada; controles.

Ensayo

Aviso: para obtener el funcionamiento óptimo, es importante realizar todos los procedimientos del mantenimiento general según lo definido en el manual del operador de IMMULITE o IMMULITE 1000.

Ver el Manual del Operador del IMMULITE o IMMULITE 1000 para: preparación, procesamiento, diluciones, ajuste, procedimientos de ensayo y control de calidad.

Inspeccionar visulamente cada unidad de rección para asegurarse de que hay una bola antes de introducirla en el Sistema.

Tenga en cuenta que hay que cargar los viales de reactivos A y B en el carrusel para ejecutar este ensayo.

Cada soporte de recipientes de muestras puede acompañarse de cuatro unidades de reacción como máximo.

Intervalo de ajuste recomendado:
2 semanas.

Muestras de Control de Calidad: Utilizar controles o pools de sueros con al menos dos niveles diferentes de EPO (bajo y alto).

Valores Esperados

Un estudio con el kit EPO IMMULITE realizado en 167 voluntarios de laboratorio aparentemente sanos dio una mediana de 10,5 mIU/ml, un 95% percentil de 20,1 mIU/ml y un intervalo absoluto de 3,7 mIU/ml a 29,5 mIU/ml.

Los resultados de EPO para pacientes con enfermedades diferentes a la anemia, deben interpretarse con precaución. En pacientes con eritrocitosis debida a hipoxia no compensada se eleva la EPO inmunorreactiva en el suero; en pacientes con hipoxia compensada, el nivel de EPO inmunorreactiva en suero se encuentra habitualmente en el intervalo normal; la EPO inmunorreactiva en suero es normal o baja en los pacientes con policitemia vera. Así, mientras que un nivel elevado de EPO en suero sugiere que la eritrocitosis es un fenómeno secundario y un nivel bajo de EPO apoya la posibilidad de una eritropoyesis autónoma, un nivel normal de EPO en suero no excluye la hipoxia ni la producción autónoma de EPO como causa de la eritrocitosis.

Estos límites han de considerarse sólo como una guía. Cada laboratorio deberá establecer sus propios intervalos de referencia.

Limitaciones

Se han observado variaciones en los resultados de EPO en presencia de anticuerpos antiespecie.

No se ha analizado la interferencia de ninguna droga con el ensayo.

Los resultados de este ensayo deben utilizarse junto con la información disponible de evaluaciones clínicas y otros procedimientos de diagnóstico.

Dado que los resultados que se obtengan con cualquier ensayo de EPO pueden ser significativamente diferentes de los

demás, es recomendable que cualquier serie de análisis que se realice sobre un mismo paciente a lo largo del tiempo se haga con el mismo análisis de EPO.

Se han observado niveles de EPO menores de los esperados en anemias asociadas a las condiciones siguientes: artritis reumatoide, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, cáncer, colitis ulcerosa, anemia falciforme y neonatos prematuros.

Después de un trasplante de médula ósea alogénica, el trastorno de la respuesta de la eritropoyetina puede retrasar su recuperación.

Los pacientes con hipergammaglobulinemia asociada a mieloma múltiple o enfermedad de Waldenstrom presentan trastornos en la producción de eritropoyetina en relación con el nivel de hemoglobina; esto se ha vinculado al aumento de viscosidad del plasma.

Los niveles de EPO de personas que viven a grandes altitudes con eritrocitosis pueden caer rápidamente a valores normales después de volver a una altitud normal.

Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas de los componentes del ensayo provocando interferencias con los inmunoanálisis in vitro. [Ver Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Las muestras de los pacientes que frecuentemente están expuestos a animales o a productos séricos animales pueden presentar este tipo de interferencia que potencialmente ocasione un resultado anómalo. Estos reactivos han sido formulados para minimizar el riesgo de interferencia, no obstante, pueden darse interacciones anómalas entre sueros conflictivos y los componentes del ensayo. Con fines de diagnóstico, los resultados obtenidos con este ensayo siempre deben ser usados en combinación con el examen clínico, la historia médica del paciente y cualquier otro dato clínico relevante.

Características Analíticas

Para ver resultados *representativos* de las cualidades del ensayo ver las tablas y los

gráficos. Los resultados se expresan en mIU/ml.

Rango de Calibración: Hasta 200 mIU/ml (WHO 2nd IRP 67/343).

Sensibilidad analítico: 1,0 mIU/ml.

Efecto de gancho a altas dosis: Ninguno hasta 50 000 mIU/ml.

Precisión: Las muestras fueron procesadas por duplicado durante 20 días, en dos tandas de trabajo por día, para un total de 40 tandas y 80 replicados. (Véase la tabla "Precisión").

Linealidad: las muestras fueron analizadas con varias diluciones. (Véase la tabla "Linealidad" para resultados representativos).

Recuperación: Se han analizado las muestras cargadas 1 en 19 con dos soluciones de EPO (85 y 777 mIU/ml). (Véase la tabla "Recuperación" para resultados representativos).

Especificidad: El anticuerpo es altamente específico para EPO. (Véase la tabla "Especificidad").

Tipo de Muestra Alternativa: Se han recogido muestras ($n = 22$) en tubos Vacutainers sin anticoagulante y heparinizados y en tubos Vacutainers con EDTA. Intervalo de concentración: aproximadamente 5,1 a 196 mIU/ml. El plasma EDTA no se recomienda en el procedimiento.

(Heparin) = 0,99 (Suero) + 0,7 mIU/ml
 $r = 0,997$

(EDTA) = 0,88 (Suero) - 3,4 mIU/ml
 $r = 0,991$

Medias:
77,7 mIU/ml (Suero)
77,6 mIU/ml (Heparin)
64,7 mIU/ml (EDTA)

Como EDTA tendría un efecto significativo en los resultados, no debe usarse como anticoagulante.

Bilirrubina: La presencia de bilirrubina conjugada y libre en concentraciones hasta 200 mg/l no tiene efecto en el ensayo, en lo concerniente a la precisión del ensayo.

Hemolisis: La presencia de hemoglobina en concentraciones de hasta 384 mg/dl puede ocasionar una bajada de los valores. (Ver la tabla de "Hemolysis".)

Lipemia: La presencia de triglicéridos en concentraciones hasta 3 000 mg/dl no tiene efecto alguno en los resultados, en lo correspondiente a la precisión del ensayo.

Comparación del Método: El ensayo se comparó con un ensayo inmunorradiométrico para EPO disponible en el mercado (Kit A), en 130 muestras de suero endógeno. (Rango de Concentración: aproximadamente 2,5 a 200 mIU/ml. Ver el gráfico.) Por regresión lineal:

(IML) = 0,85 (Kit A) + 3,8 mIU/ml
 $r = 0,978$

Medias:
41 mIU/ml (IMMULITE)
44 mIU/ml (Kit A)

Asistencia técnica

Contáctese con su Distribuidor Nacional.

Fabricado por EURO/DPC Ltd. bajo un Sistema de Calidad acorde con la ISO 13485:2003.

Français

IMMULITE EPO

Domaine d'utilisation : dosage quantitatif de l'EPO dans le sérum ou le plasma hépariné. Ce test est réservé à un usage diagnostic *in vitro* avec l'Analyseur IMMULITE et de IMMULITE 1000, et constitue une aide au diagnostic des anémies et polyglobulies.

Référence catalogue : **LKEPZ** (50 tests), **LKEP1** (100 tests)

Code produit : **EPO**
Code color : **vert clair**

Introduction

L'érythropoïétine (EPO) est une hormone glycoprotéique composée de 165 acides aminés avec 4 chaînes carbohydrates complexes attachées au peptide par 4 sites de liaison.¹ Son poids moléculaire est de 36 000 Daltons, 40% de ce poids étant celui des chaînes carbohydrates. L'EPO est le régulateur primaire de l'érythropoïèse, il stimule la prolifération et la différenciation des cellules précurseurs de la lignée érythrocytaire dans la moelle osseuse. Chez les mammifères, le foie du

foetus produit presque la totalité de cette hormone. Chez l'adulte, la production hépatique est de moins de 10% et la sécrétion rénale de plus de 90%.^{2,3} On pense que le site de production se trouve dans les cellules du tube proximal rénal ou au niveau des cellules endothéliales capillaires périrubulaires du cortex rénal et de la medulla externe. La clairance de l'EPO circulante n'a pas été complètement élucidée, elle se fait pour une petite partie par excrétion urinaire et probablement également par élimination hépatique et par assimilation dans les cellules cibles de la moelle osseuse.

L'EPO contrôle la production de globules rouges afin de répondre à la demande en oxygène des tissus.¹ Elle exerce son effet par un système complexe de rétrocontrôle dans lequel la sécrétion rénale de l'hormone est contrôlée par un capteur d'oxygène dans le rein qui répond à la pression partielle en oxygène du sang. Dans le cas où l'oxygène périphérique augmente, le taux d'EPO diminue. Cela a été constaté en cas de correction de l'hypoxie chez des sujets sains (comme redescendre d'une haute altitude) et après une hypertransfusion

Les anémies peuvent être divisées en deux catégories selon les taux d'EPO dans le sang : les primaires et les secondaires. Les anémies primaires sont caractérisées par une augmentation de l'EPO dans le sang pour tenter de ramener à la normale la production des globules rouges. L'anémie par carence martiale, la réduction du flux sanguin vers le rein (comme lors d'une perte de sang) et les hémoglobinopathies avec une affinité augmentée de l'hémoglobine pour l'oxygène¹ sont des exemples d'anémies dans lesquelles les taux d'EPO sont élevés. On observe une augmentation exponentielle du taux de production de l'EPO avec la diminution de l'oxygène disponible et la chute de l'hématocrite en cas d'anémies non rénales ; dans ce dernier cas, des taux d'EPO 1 000 fois supérieurs à la normale ont été observés.²

L'anémie peut être secondaire à une inflammation, à une arthrite rhumatoïde, à un cancer et aux maladies rénales chroniques. Les « anémies secondaires » peuvent toutefois être attribuées, au moins en partie, à une sous-production d'EPO.⁴

L'incapacité à produire suffisamment d'EPO est responsable d'anémies modérées à sévères observées au stade terminal des maladies rénales. La diminution de la production d'EPO est attribuée à la destruction des sites de production du rein ; le capteur d'oxygène dans le rein peut également être atteint. Les taux d'hormones sont légèrement supérieurs au domaine de référence et ne sont pas adaptés pour répondre à une perte de sang due à la dialyse, à une durée de vie des globules rouges raccourcie, à un déficit en fer ou folate, à une diminution du fer absorbé par les cellules précurseurs de la lignée érythrocytaire et autres situations auxquelles font face de tels patients. Les patients anéphriques ont des taux d'EPO spécialement bas. Quelques patients ayant des insuffisances rénales chroniques présentent toutefois un hématocrite normal ou une anémie moins sérieuse avec des taux d'EPO élevés. Certains de ces patients ont des reins kystiques ou une hépatite virale ; dans ce dernier cas, une augmentation d'EPO peut s'expliquer par une production hépatique augmentée.

La surproduction de globules rouges est appelée polyglobulie. Les polyglobulies peuvent également être divisées en deux catégories selon que leur apparition est primaire ou secondaire au taux d'EPO. Dans le cas de polyglobulie vraie, le taux d'EPO est diminué et l'érythropoïèse est primaire et indépendante de la stimulation par l'EPO. Les concentrations d'EPO peuvent être multipliées par 10 pour différents patients avec le même hématocrite.

Certains états sont caractérisés par la perte du rétrocontrôle des concentrations d'oxygène sur la production d'EPO, provoquant une augmentation des taux d'EPO.³ C'est observé au cours des carcinomes rénaux, 2% des patients présentent une polyglobulie, et au cours de lésions rénales bénignes comme les kystes rénaux simples ou multiples, les sténoses artérielles rénales et les anomalies microvasculaires. De plus environ 10% des transplantés du rein développent une polyglobulie provenant parfois d'une maladie autologue du rein.

La polyglobulie secondaire est caractérisée par une concentration élevée

d'EPO qui conduit à une augmentation de la masse des cellules rouges. Cette condition peut provenir de divers facteurs, incluant une hémoglobine déficiente, le tabac, une fibrose pulmonaire, une maladie cardiaque, des tumeurs et des calculs rénaux.³

Lors du dosage de l'EPO dans le diagnostic étiologique des polyglobulies, il peut y avoir chevauchement entre les valeurs des polyglobulies secondaires ou vraies et les valeurs de référence.³

Principe du test

IMMULITE/IMMULITE 1000 EPO est un dosage chimiluminescent immunométrique, en phase solide.

Cycles d'incubation : 2 x 30 minutes.

Recueil des échantillons

Des variations diurnes de l'érythropoïétine sont rapportées dans la littérature⁷⁻⁹. Il est important que les échantillons soient prélevés à un moment précis de la journée. Des prélèvements matinaux entre 7h30 et 12h00 sont recommandés.

Il est possible que les valeurs varient si l'échantillon n'est pas coagulé à température ambiante (+15°C/+28°C).

L'EDTA étant susceptible d'avoir un impact significatif sur les résultats, il ne devrait pas être utilisé comme anti-coagulant.

Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Des échantillons hémolysés ou fortement contaminés peuvent donner des résultats erronés.

La centrifugation des échantillons sériques avant la formation complète du caillot peut entraîner la présence de fibrine. Pour éviter les résultats erronés dus à la présence de fibrine, s'assurer de la formation complète du caillot avant de centrifuger les échantillons. Certains échantillons, en particulier ceux provenant de patients sous anti-coagulants, peuvent nécessiter un temps plus long pour la formation du caillot.

Des tubes pour prélèvements sanguins provenant de fabricants différents peuvent donner des résultats différents, selon les matériaux et additifs utilisés, y compris

gels ou barrières physiques, activateurs de la coagulation et/ou anticoagulants. Le coffret EPO IMMULITE/IMMULITE 1000 n'a pas été testé sur tous les types de tubes possibles. Veuillez consulter le chapitre intitulé Autres Types d'Échantillons pour plus de renseignements sur les tubes qui ont été évalués.

Volume nécessaire : 100 µl de sérum ou de plasma hépariné. (Le godet échantillon doit pouvoir contenir au moins 250 µl de plus que le volume total nécessaire.)

Conservation : 7 jours à +2°C/+8°C ou 2 mois à -20°C. Éviter de multiplier les cycles congélation/ décongélation.

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Réactifs : conserver les réactifs à +2°/+8 °C. Éliminer les déchets conformément à la réglementation en vigueur.

Respecter les précautions d'emploi et manipuler tous les composants du coffret comme des produits potentiellement infectieux. Les réactifs dérivés de produits humains et utilisés dans ce coffret ont subi un test sérologique pour la Syphilis et des tests de dépistage pour les anticorps anti-VIH1 et 2, anti-VHC et pour l'antigène de surface de l'hépatite B, qui se sont tous avérés négatifs.

De l'azide de sodium à des concentrations inférieures à 0,1 g/dl a été ajouté comme conservateur ; lors de l'élimination, l'évacuer avec de grandes quantités d'eau pour éviter une accumulation d'azides métalliques explosifs dans les canalisations.

Substrat chimiluminescent : éviter toute contamination et l'exposition directe à la lumière solaire (voir la fiche technique).

Eau : utiliser uniquement de l'eau distillée ou désionisée.

Matériel fourni

Les composants de la trousse ne peuvent être utilisés que conjointement. Les étiquettes à code-barre sont nécessaires au dosage.

Tests unitaires EPO (LEP1)

Chaque unité à code-barre contient une bille revêtue d'anti-ligand dérivé de la

streptavidine. Stable à +2°/ +8 °C jusqu'à la date de péremption.

LKEPZ: 50 unités.

LKEP1: 100 unités.

Porter les sachets à température ambiante avant d'ouvrir. Ouvrir le sachet avec des ciseaux en préservant le dispositif de fermeture. Refermer les sachets pour les protéger de l'humidité.

Cartouches de réactif EPO (LEPA, LEPB)

Avec code-barre. **LEPA** : 7,5 ml d'un anticorps monoclonal murin anti-EPO marqué par un ligand avec conservateur.

LEPB : 7,5 ml d'un anticorps polyclonal de chèvre anti-EPO conjugué à de la phosphatase alcaline dans un tampon avec conservateur. Conserver bouché et réfrigéré : stable à +2°/ +8 °C jusqu'à la date de péremption. A utiliser de préférence dans les 30 jours qui suivent l'ouverture, si les recommandations de stockage sont respectées.

LKEPZ: 1 jeu. **LKEP1**: 1 jeu.

Ajusteurs EPO (LEPL, LEPH)

2 flacons d'ajusteurs (« bas » et « haut ») contenant de l'EPO recombinante humaine lyophilisée dans une matrice de sérum non humain avec conservateur. 30 minutes au minimum avant l'emploi :

Reconstituer chaque flacon avec **4,0 ml** d'eau distillée ou désionisée. Mélanger en imprimant un léger mouvement circulaire ou en retournant délicatement jusqu'à complète dissolution de la substance lyophilisée. Stable à +2°/ +8 °C pendant 30 jours après reconstitution, ou 6 mois (aliquotés) à -20 °C.

LKEPZ: 1 jeu. **LKEP1**: 1 jeu.

Composants du coffret fournis séparément

Diluant EPO (LEPZ)

Pour la dilution manuelle des échantillons cliniques. Un flacon (25 ml) contenant une matrice sérique non humaine exempte d'EPO, avec conservateur. Stable à +2°/ +8 °C pendant 30 jours après ouverture, ou 6 mois (aliquoté) à -20 °C.

LSUBX : Substrat chimiluminescent

LPWS2 : Solution de lavage

LKPM : Coffret de décontamination de l'aiguille de prélèvement

LCHx-y : Supports pour godets

échantillons (avec code-barre)

LSCP : Godets échantillons (à usage unique)

LSCC : Bouchons pour godets échantillons (optionnel)

LEPCM : Contrôle EPO, à trois niveaux de concentration.

Egalement requis

Pipettes pour le transfert d'échantillon ; eau distillée ou désionisée ; Contrôles.

Protocole de dosage

Noter que pour des performances optimales, il est important de réaliser toutes les procédures de maintenance de routine selon les instructions du Manuel d'Utilisation de l'IMMULITE ou de l'IMMULITE 1000.

Voir le manuel d'utilisation de l'IMMULITE ou de l'IMMULITE 1000 pour la préparation, le démarrage du système, les ajustements, le dosage et les procédures de contrôle de qualité.

Vérifier visuellement que chaque Unité-Test contient bien une bille avant de la charger dans l'automate.

Noter que les deux cartouches de réactif A et B doivent être placées sur le carrousel pour réaliser ce dosage.

Chaque unité-échantillon peut être suivie par jusqu'à quatre unités-tests.

Intervalle d'ajustement recommandé : 2 semaines.

Echantillons pour le contrôle de qualité : utiliser des Contrôles ou des pools d'échantillons avec au moins deux niveaux de concentration (faible ou élevé) d'EPO.

Valeurs de référence

Une étude réalisée avec le coffret EPO IMMULITE de DPC sur 167 volontaires de laboratoire sains donna une médiane de 10,5 mUI/ml, de 20,1 mUI/ml au 95^{ème} percentile et un domaine absolu allant de 3,7 mUI/ml à 29,5 mUI/ml.

Il faut faire attention lors de l'interprétation des résultats d' EPO de patients atteints d'autres maladies que l'anémie. En effet chez les patients ayant une polyglobulie due à une hypoxie non compensée, le taux sérique d'EPO est élevé ; chez ceux dont l'hypoxie est compensée, la

concentration en EPO sérique est généralement dans la zone normale et chez les patients atteints de polyglobulie vraie, le niveau d'EPO sérique est soit normal soit bas. Ainsi, un taux élevé d'EPO sérique suggère que la polyglobulie est un phénomène secondaire et un taux abaissé d'EPO sérique laisse supposer une érythropoïèse autonome, un taux normal d'EPO sérique n'exclut quant à lui ni l'hypoxie ni la production autonome d'EPO comme cause de polyglobulie.

Utiliser ces valeurs à *titre indicatif* uniquement. Chaque laboratoire devra établir ses propres valeurs de référence.

Limites

Des variations de résultats en EPO ont été observées en présence d'anticorps anti-espèce.

Aucun médicament n'a été testé pour une éventuelle réaction croisée avec le dosage.

Les résultats de ce dosage doivent être interprétés en tenant compte des données cliniques et des autres méthodes diagnostiques.

Etant donné que les résultats obtenus peuvent varier significativement suivant la méthode de dosage de l'EPO utilisée, il est recommandé de conserver la même méthode pour tout suivi de patient.

Des taux d'EPO abaissés peuvent être rencontrés dans le cas d'anémies associées à de l'arthrite rhumatoïde, un syndrome d'immunodéficience acquise, un cancer, une colite ulcéreuse, une drépanocytose et chez les nouveau-nés prématurés.

Après une transplantation allogénique de moelle osseuse, une réponse altérée de l'érythropoïétine peut retarder le retour à la normale de l'érythropoïétine.

Les patients atteints d'hypergamma-globulinémie associée à un myélome multiple ou à la maladie de Waldenström ont une production inadaptée d'érythropoïétine en relation avec la concentration en hémoglobine, ceci est lié à une viscosité plasmatique augmentée.

Les taux d'EPO des personnes qui vivent en altitude avec une polyglobulie peuvent rapidement descendre à des valeurs

normales quand ces personnes reviennent à des altitudes plus basses.

Les anticorps hétérophiles du sérum humain peuvent réagir avec les immunoglobulines faisant partie des composants du coffret et interférer avec les immunodosages in vitro. [Voir Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Les échantillons provenant de patients fréquemment exposés aux animaux ou aux produits sériques d'origine animale peuvent présenter ce type d'interférence pouvant potentiellement donner un résultat anormal. Ces réactifs ont été mis au point afin de minimiser le risque d'interférence, cependant des interactions potentielles entre des sérums exceptionnels et les composants du test peuvent se produire. Dans un but diagnostique, les résultats obtenus avec ce dosage doivent toujours être utilisés en association avec un examen clinique, l'histoire médicale du patient et d'autres résultats.

Performances du test

Consulter les tableaux et graphiques pour obtenir les données *représentatives* des performances de ce test. Les résultats sont donnés en mUI/ml.

Intervalle de linéarité : jusqu'à 200 mUI/ml (WHO 2nd IRP 67/343).

Sensibilité analytique : 1,0 mUI/ml.

Accoutumance aux doses élevées : aucune jusqu'à 50 000 mUI/ml.

Précision : les échantillons sont dosés en duplicata sur une période qui s'étend sur 20 jours, avec deux séries par jours, soit 40 séries et 80 replicata au total. (Voir le tableau « Precision ».)

Test de dilution : des échantillons ont été dosés à différentes concentrations. (Voir le tableau « Linearity » pour des données représentatives.)

Test de récupération : des échantillons dosés ont été chargés dans une proportion de 1 à 19 avec deux solutions d'EPO (85 et 777 mUI/ml). (Voir le tableau « Recovery » pour des données représentatives.)

Spécificité : l'anticorps utilisé est hautement spécifique de l'EPO. (Voir le tableau « Specificity ».)

Autres types d'échantillons: les échantillons ($n = 22$) ont été recueillis sur tubes secs, vacutainer héparinés ou contenant de l'EDTA. Intervalle de concentrations : 5,1 à 196 mUI/ml. Le plasma EDTA est déconseillé.

(Héparine) = 0,99 (Sérum) + 0,7 mUI/ml
 $r = 0,997$

(EDTA) = 0,88 (Sérum) – 3,4 mUI/ml
 $r = 0,991$

Moyennes :
77,7 mUI/ml (Sérum)
77,6 mUI/ml (Héparine)
64,7 mUI/ml (EDTA)

L'EDTA étant susceptible d'avoir un impact significatif sur les résultats, il ne devrait pas être utilisé comme anti-coagulant.

Bilirubine : La présence de bilirubine, conjuguée ou non, n'a aucun effet sur le dosage ni sur sa précision si la concentration ne dépasse pas 200 mg/l

Hémolyse: La présence d'hémoglobine, à des concentrations allant jusqu'à 384 mg/dl, peut entraîner une baisse des valeurs. (voir le tableau "Hémolyse".)

Lipémie : La présence de triglycérides jusqu'à une concentration de 3 000 mg/dl n'interfère ni sur la précision du dosage, ni sur les résultats.

Comparaison de méthodes : Le dosage a été comparé à un test immunoradiométrique disponible dans le commerce (Coffret A) sur 130 échantillons sériques endogènes (intervalle de concentrations : 2,5 à 200 mUI/ml environ. Voir graphique). Par régression linéaire :

(IML) = 0,85 (Trousse A) + 3,8 mUI/ml
 $r = 0,978$

Moyennes :
41 mUI/ml (IMMULITE)
44 mUI/ml (Trousse A)

Assistance technique

En France distribué par DPC France 90 bd National 92257 La Garenne-Colombes.

Fabriqué par EURO/DPC Ltd. dans le cadre d'un Système Qualité enregistré sous ISO 13485:2003.

Italiano

EPO

Uso: Ad uso diagnostico *in vitro* con gli Analizzatori IMMULITE ed IMMULITE 1000 — per la misurazione quantitativa dell'Eritropoietina (EPO) nel siero o nel plasma eparinizzato, quale ausilio nella diagnosi delle anemie e delle policitemie.

Numero di Codice: **LKEPZ** (50 test), **LKEP1** (100 test)

Codice del Test: **EPO**
Colore: **verde chiaro**

Riassunto e Spiegazione del Test

L'Eritropoietina (EPO) è un ormone glicoproteico composto da 165 aminoacidi, con quattro catene di carboidrati complessi attaccate al peptide in quattro siti di collegamento.¹ Ha un peso molecolare di 36 000 dalton, 40% del quale attribuito alle catene dei carboidrati. L'EPO è il regolatore principale dell'eritropoiesi, stimolando la proliferazione e la differenziazione delle cellule precursori degli eritroidi nel midollo osseo. Nei mammiferi, il fegato del feto produce quasi tutto l'ormone; negli adulti, la produzione epatica diminuisce ad un livello inferiore al 10% e la secrezione renale raggiunge un livello superiore al 90%.^{2,3} Si pensa che il sito di produzione siano le cellule tubulari renali proximali o le cellule endoteliali capillari peritubulari della corteccia renale e la medulla esterna. Non è stata ancora completamente spiegata l'eliminazione dell'EPO circolante, ma la stessa viene effettuata, almeno parzialmente, attraverso le urine, ed anche attraverso il fegato ed attraverso "uptake" nelle cellule bersaglio del midollo osseo.

L'EPO regola la produzione di globuli rossi nel sangue per soddisfare le esigenze di ossigenazione delle cellule.¹ Esercita il proprio effetto in un sistema complesso di feedback, nel quale la secrezione renale dell'ormone viene controllata da un sensore dell'ossigeno nei reni che risponde alla pressione parziale dell'ossigeno nel sangue. In condizioni di livelli elevati di ossigeno periferico, i livelli

di EPO diminuiscono. Questa situazione viene riscontrata dopo correzione dell'ipossia in soggetti normali (come nella discesa dall'alta quota) e dopo ipertrasfusione.

E' possibile dividere le anemie in due categorie rispetto ai livelli di EPO nel sangue: quelle primarie rispetto ai livelli di EPO e quelle secondarie. Le anemie primarie sono caratterizzate da un aumento dell'EPO nel sangue in un tentativo di riportare alla normalità i livelli di produzione dei globuli rossi nel sangue. Alcuni esempi di anemie nelle quali i livelli di EPO sono elevati sono l'anemia dovuta a carenza di ferro, nella riduzione del flusso di sangue ai reni (come nel caso di perdite di sangue) e nelle emoglobinopatie con un'affinità maggiore dell'emoglobina per l'ossigeno.¹ Il tasso di produzione di EPO aumenta in modo esponenziale con la diminuzione dell'ossigeno disponibile e la diminuzione dell'ematocrito in anemie non renali; nell'ultimo caso, sono stati registrati livelli di EPO 1 000 volte superiori al normale.²

L'anemia può essere secondaria dovuta ad un'inflammazione, all'artrite reumatoide, al neoplasma, e a malattie renali croniche. Comunque, le "anemie secondarie" possono contribuire, almeno parzialmente, alla sottoproduzione di EPO.⁴

L'incapacità di produrre quantità di EPO sufficienti giustifica la presenza di anemie da moderate a gravi osservate nelle ultime fasi della malattia renale. La produzione diminuita di EPO viene attribuita alla distruzione dei siti renali di produzione. Il sensore renale dell'ossigeno può esserne influenzato. I livelli dell'ormone sono superiori al range di riferimento e non sono idonei per compensare la perdita di sangue dovuta a dialisi, all'emivita abbreviata dei globuli rossi, alla carenza di ferro e di folati, ed al trasferimento ostacolato del ferro alle cellule eritroidi progenitrici, e ad altri problemi fronteggiati da questi pazienti. I pazienti anefrici mostrano livelli di EPO particolarmente bassi. Alcuni pazienti con blocco cronico dei reni, comunque, mostrano ematocrito normale o anemia meno seria, ed un livello elevato di EPO. Alcuni di questi pazienti hanno reni cistici o epatite virale; negli ultimi, è possibile che i livelli elevati

di EPO siano stati causati da una produzione epatica migliorata.

La sovrapproduzione di globuli rossi del sangue si chiama policitemia. E' possibile dividere le policitemie in due categorie rispetto ai livelli di EPO nel sangue: quelle primarie rispetto ai livelli di EPO e quelle secondarie. Nella policitemia vera, i livelli di EPO sono diminuiti, e l'eritropoiesi è primaria rispetto ad essi ed indipendente dalla stimolazione dell'EPO. Le variazioni nei valori di EPO possono arrivare fino a dieci volte per pazienti diversi con lo stesso ematocrito.

Altre condizioni possono essere caratterizzate dalla perdita del controllo delle concentrazioni di ossigeno nella produzione di EPO, causando un aumento nei livelli della stessa.³ Questi includono i carcinomi delle cellule renali, in cui il 2% dei pazienti mostrano eritrocitosi, ed alcune lesioni renali benigne, come cisti renali individuali o molteplici, stenosi dell'arteria renale ed anomalie microvascolari. Inoltre, circa il 10% dei pazienti che hanno subito trapianto renale sviluppano eritrocitosi, a volte dai reni autologhi malati.

La policitemia secondaria è caratterizzata da livelli elevati di EPO che portano all'aumento della massa dei globuli rossi nel sangue. Questa condizione può essere causata da diversi fattori, inclusa emoglobina diftettosa, fumo, fibrosi polmonare, malattie cardiache, tumori e calcoli renali.⁵

Durante il dosaggio dell'EPO per la diagnosi differenziale delle policitemie, è necessario considerare l'eventuale sovrapposizione dei valori per l'eritrocitosi secondaria o per la policitemia vera con quelli nel range di riferimento.³

Principio del Dosaggio

IMMULITE/IMMULITE 1000 EPO è un dosaggio immunometrico in chemiluminescenza in fase solida.

Cicli d'incubazione: 2 x 30 minuti.

Prelievo dei Campioni

In letteratura sono state riscontrate diverse manifestazioni di una variazione giornaliera dell'eritropoietina.⁷⁻⁹ E' importante prelevare i campioni ad un'ora

significativa durante il giorno. Si consiglia di prelevare i campioni della mattina tra le 7,30 e le 12,00.

Può esserci una variazione nei valori se il campione non è coagulato a temperatura ambiente (15–28°C).

Perché l'EDTA avrebbe un effetto significativo sui risultati, non dovrebbe essere utilizzato come un anticoagulante.

Si consiglia l'utilizzo di un'ultracentrifuga per schiarire i campioni lipemici.

I campioni emolizzati o grossolamente contaminati possono produrre risultati errati.

La centrifugazione dei campioni del siero prima che la coagulazione sia completa può produrre fibrina. Per evitare risultati errati dovuti alla presenza di fibrina, assicurarsi che il processo di coagulazione sia completo prima di centrifugare i campioni. Alcuni campioni, in modo particolare quelli di pazienti sottoposti a terapia con anticoagulanti, possono richiedere tempi di coagulazione più lunghi.

Provette per il prelievo di sangue di produttori diversi possono dare valori differenti, a seconda dei materiali e degli additivi usati, incluso gel o barriere fisiche, attivatori di coaguli e/o anticoagulanti. L'IMMULITE/IMMULITE 1000 EPO non è stato verificato con tutte le possibili variazioni di tipi di provette. Consultare la sezione riguardante Campioni Alternativi per dettagli sulle provette testate.

Volume richiesto: 100 µL di siero o plasma eparinizzato. (Il porta campioni deve contenere almeno 250 µL più del volume totale richiesto).

Conservazione: 7 giorni a 2–8°C o 2 mesi a –20°C. Evitare cicli di congelamento/scongelamento ripetuti.

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare i reagenti a 2–8°C. Eliminare in conformità alle leggi vigenti.

Seguire le precauzioni generali e manipolare tutti i componenti come se fossero potenzialmente infetti. I materiali derivati dal sangue umano sono stati testati con esito negativo per la sifilide, gli anticorpi anti-HIV 1 e 2, l'Antigene di

Superficie dell'Epatite B e gli anticorpi Anti-Epatite C.

E' stata aggiunta Sodio Azide a concentrazioni inferiori a 0,1 g/dL come conservante. Al momento dell'eliminazione, irrorare con molta acqua per evitare la formazione di azidi metalliche potenzialmente esplosive nelle tubature di piombo e di rame.

Sottostrato chemiluminescente: Evitare la contaminazione e l'esposizione alla luce del sole diretta. (Vedere l'inserimento).

Acqua: Utilizzare acqua distillata o deionizzata.

Materiali Forniti

I componenti sono un gruppo accoppiato. Le etichette del codice a barra sono necessarie per la prova.

Test Unit EPO (LEP1)

Ogni test unit con codice a barra contiene una biglie coattata con un anti-ligando derivato dalla streptavidina. Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza.

LKEPZ: 50 unit. **LKEP1:** 100 unit.

Le buste delle test unit devono essere a temperatura ambientale prima di aprire. Aprire tagliando lungo il bordo superiore, lasciando intatto la chiusura ermetica. Risigillare le buste per proteggere contro umidità.

Porta Reagente EPO (LEPA, LEPB)

Con codice a barre. **LEPA:** 7,5 mL di un anticorpo monoclonale murino anti-EPO marcato con enzima, con conservanti.

LEPB: 7,5 mL di fosfatasi alcalina coniugata con un anticorpo policlonale di capra anti-EPO in un tampone, con conservanti. Conservare chiuso nel frigorifero: stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza. Si consiglia di utilizzare il prodotto entro 30 giorni dall'apertura se conservato nella maniera indicata.

LKEPZ: 1 set. **LKEP1:** 1 set.

Calibratori EPO (LEPL, LEPH)

Due flaconi (Basso ed Alto), contenenti EPO ricombinante umana liofila in una matrice di siero non umano con conservanti. Almeno 30 minuti prima dell'uso: ricostituire ogni flacone con **4,0 mL** di acqua distillata o deionizzata. Mescolare agitando delicatamente o invertendo la miscela finché il materiale

liofilo sia completamente dissolto. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo la ricostituzione, o per 6 mesi (aliquotato) a –20°C.

LKEPZ: 1 set. **LKEP1:** 1 set.

Componenti del kit forniti separatamente

Diluyente dell'EPO (LEPZ)

Per la diluizione manuale dei campioni dei pazienti. Una fiala (25 mL) di siero non umano privo di EPO, con conservanti. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura, o per 6 mesi (aliquotato) a –20°C.

LSUBX: Substrato Chemiluminescente

LPWS2: Tampone di lavaggio dell'Ago

LKPM: Kit di Pulizia dell'Ago

LCHx-y: Tubi porta campioni (con codice a barre)

LSCP: Porta Campioni (monouso)

LSCC: Coperchi per Porta Campioni (opzionali)

LEPCM: Controllo EPO a tre livelli

Materiali richiesti

Pipette per la dispensazione dei campioni; acqua distillata o deionizzata; controlli.

Procedura del Dosaggio

Attenzione: per avere prestazioni ottimali, è importante effettuare le procedure di manutenzione di routine cosiccome definito nel Manuale dell'Operatore IMMULITE o IMMULITE 1000.

Vedi il Manuale dell'Operatore IMMULITE o IMMULITE 1000 per: preparazione, setup, diluizione, calibrazione, dosaggio e controllo di qualità.

Controllate ogni test unit verificando la presenza della sferetta prima di caricarla sullo strumento.

E' importante notare che i due cunei reagenti A e B devono essere caricati sul carosello per eseguire questa prova.

Ogni tubo porta campioni può essere seguito da quattro test unit.

Intervallo di Calibrazione Consigliato: 2 settimane.

Controllo di Qualità: Utilizzare controlli o pool di sieri con almeno due livelli (alto e basso) di EPO.

I valori attesi

Uno studio effettuato con il kit DPC IMMULITE EPO su 167 volontari di laboratorio in apparente buono stato di salute ha prodotto una media di 10,5 mIU/ml, un 95° percentile di 20,1 mIU/ml ed un range assoluto da 3,7 mIU/ml a 29,5 mIU/ml.

Si consiglia di essere prudenti nell'interpretazione dei risultati di EPO per pazienti con malattie diverse dall'anemia. In pazienti con eritrocitosi dovuta ad epossia non compensata, il siero immunoreattivo all'EPO è elevato; in pazienti con ipossia compensata, il livello dell'EPO immunoreattiva rientra nel range di normalità, ed in pazienti con policitemia vera, il livello di EPO immunoreattiva è normale o basso. Per questo motivo, mentre livelli di EPO elevati suggeriscono che l'eritrocitosi è un fenomeno secondario e livelli di EPO bassi suggeriscono la possibilità di eritropoiesi autonoma, livelli di EPO normali non escludono l'ipossia o la produzione autonoma di EPO come causa di eritrocitosi.

Considerare questi limiti soltanto come *linee guida*. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire le proprie gamme di riferimento.

Limiti

Sono state riscontrate variazioni nei risultati di EPO nella presenza degli anticorpi anti-specie.

Nessun farmaco è stato analizzato per le interferenze nel dosaggio.

I risultati di questo dosaggio devono essere utilizzati in combinazione con le informazioni disponibili dalle analisi cliniche e da altre procedure diagnostiche.

Poichè i risultati ottenuti con un qualsivoglia dosaggio dell'EPO possono variare in maniera significativa rispetto ai risultati ottenuti con altri dosaggi, si consiglia di effettuare i dosaggi in serie sullo stesso paziente nel tempo utilizzando sempre lo stesso dosaggio.

Sono stati riscontrati livelli di EPO inferiori ai livelli attesi nelle anemie associate ai seguenti stati clinici: artrite reumatoide, sindrome da immunodeficienza acquisita, cancro, colite ulcerosa, anemia falciforme, ed in neonati prematuri.

Dopo trapianto allogenico del midollo osseo, la risposta eritropoietina ostacolata può ritardare il recupero dell'eritropoietina.

In pazienti con ipergammaglobulinemia associata con mieloma multiplo o con malattia di Waldenstrom si ha una produzione ostacolata dell'eritropoietina rispetto alla concentrazione dell'emoglobina, e questo è stato collegato alla viscosità elevata del plasma.

I livelli di EPO di persone che abitano ad altitudini elevate con eritrocitosi possono diminuire rapidamente a livelli normali dopo essere tornati a livello del mare.

Gli anticorpi eterofili presenti nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline presenti nelle componenti del dosaggio provocando un'interferenza con i dosaggi in vitro. [Vedi Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Campioni di pazienti routinariamente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero di animali possono presentare questo tipo di interferenza causa potenziale di risultati anomali. Questi reagenti sono stati formulati per minimizzare il rischio di interferenze, tuttavia, possono verificarsi interazioni potenziali tra sieri rari e componenti del test. A scopo diagnostico, i risultati ottenuti da questo dosaggio devono sempre essere utilizzati unitamente all'esame clinico, all'anamnesi del paziente e ad altre indagini di laboratorio.

Prestazioni del Dosaggio

Vedi tavole e grafici per i dati *rappresentativi*. I risultati sono indicati in mIU/mL.

Range di calibrazione: Fino a 200 mIU/mL (WHO 2nd IRP 67-343).

Sensibilità analitica: 1,0 mIU/mL.

Effetto Aggancio per Dosi Elevate: Nessuno fino a 50 000 mIU/mL.

Precisione: I campioni sono stati elaborati in doppio da 20 giorni, due esecuzioni al giorno, per un totale di 40 esecuzioni e 80 ripetizioni. (Vedere la tabella "Precisione")

Linearità: I campioni sono stati provati sotto varie diluzioni (Vedere la tabella "Linearità per i dati rappresentativi").

Ricupero: Sono stati analizzati i campioni etichettati da 1 a 19 con due soluzioni (85 e 777 mIU/mL) di EPO (Vedere la tabella "Ricupero per i dati rappresentativi").

Specificità: L'anticorpo è molto specifico per EPO. (Vedere la tabella "Specificità".)

Tipo di campione alternativo: I campioni ($n = 22$) sono stati prelevati in provette semplici, eparinizzate o vacutainer EDTA. Gamma di concentrazione: da 5,1 a 196 mIU/mL. Il plasma EDTA non è raccomandato nel procedimento.

(Heparin) = 0,99 (Siero) + 0,7 mIU/mL
 $r = 0,997$

(EDTA) = 0,88 (Siero) - 3,4 mIU/mL
 $r = 0,991$

Valore medio:
77,7 mIU/mL (Siero)
77,6 mIU/mL (Heparin)
64,7 mIU/mL (EDTA)

Perché l'EDTA avrebbe un effetto significativo sui risultati, non dovrebbe essere utilizzato come un anticoagulante.

Bilirubina: La presenza di bilirubina coniugata e non coniugata in concentrazioni fino a 200 mg/L non ha nessun effetto entro il range di precisione del dosaggio.

Emolisi: La presenza di emoglobina in concentrazioni fino a 384 mg/dL può causare un decremento dei valori (Vedi tabella "Hemolysis").

Lipemia: La presenza di trigliceridi in concentrazioni fino a 3 000 mg/dL non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Confronto di Metodi: Il dosaggio è stato comparato ad un'immunodosaggio per l'EPO disponibile sul mercato (Kit A) in 130 campioni di siero endogeni. (Range di concentrazione: da 2,5 fino a 200 mIU/ml. Vedi grafico.) Con regressione lineare:

(IML) = 0,85 (Kit A) + 3,8 mIU/mL
 $r = 0,978$

Valor medio:
41 mIU/mL (IMMULITE)
44 mIU/mL (Kit A)

Assistenza Tecnica

All'estero: Si prega di contattare il proprio Distributore DPC Nazionale.

Prodotto dalla EURO/DPC Ltd. nell'ambito di un Sistema di Qualità Certificato ISO 13485:2003.

Português

EPO

Utilização: Para uso diagnóstico *in vitro* nos analisadores IMMULITE e IMMULITE 1000 — para o doseamento quantitativo da eritropoietina (EPO) em soro ou plasma heparinizado, como auxiliar no diagnóstico de anemias e policitêmias.

Números de catálogo: **LKEPZ** (50 testes), **LKEP1** (100 testes)

Código do teste: **EPO**

Cor: **Verde claro**

Sumário e explicação do teste

A eritropoietina (EPO) é uma hormona glicoproteica que consiste em 165 aminoácidos, com 4 cadeias complexas de hidratos de carbono ligados ao péptido em quatro locais de ligação. Tem um peso molecular de 36 000 daltons, 40% deste atribuído às cadeias de hidratos de carbono. A EPO é o principal regulador da eritropoiese, estimulando a proliferação e diferenciação de células precursoras eritróides na medula óssea. Em mamíferos, o fígado fetal produz quase a totalidade da hormona; em adultos, a produção hepática baixa para menos de 10% e a secreção renal é responsável por mais de 90%.^{2,3} Acredita-se que o local de produção seja nas células tubulares renais proximais ou nas células endoteliais capilares peritubulares do córtex renal e medula externa. A “clearance” de EPO circulante não tem sido totalmente explicada, mas é realizada, numa pequena parte, pela excreção urinária, e possivelmente também pela eliminação hepática e pela captação em células alvo na medula óssea.

A EPO ajusta a produção de células vermelhas para poder satisfazer as exigências de oxigénio do tecido.¹ Exerce o seu efeito através dum sistema complexo de “feedback”, no qual a secreção renal da hormona é controlada por um sensor de oxigénio no rim que responde à pressão parcial de oxigénio no sangue. Sob condições de aumento de oxigénio periférico, os níveis de EPO diminuem. Isto é observado após a

correção de hipóxia em indivíduos saudáveis (como uma descida de uma elevação alta) e após a hipertransusão.

As anemias podem ser divididas em duas categorias relativamente a níveis de EPO no sangue: Aquelas que são principalmente para níveis de EPO e aquelas que são secundárias. As anemias primárias são caracterizadas por um aumento de EPO no sangue para tentar normalizar os níveis de produção de células vermelhas. Exemplos de anemias no qual os níveis de EPO são elevados incluem anemias de deficiência de ferro, redução do fluxo sanguíneo nos rins (como perda de sangue) e hemoglobinopatias com maior afinidade de hemoglobina para oxigénio.¹ Tem-se verificado um aumento da taxa de produção de EPO exponencialmente à diminuição de oxigénio disponível e com a queda de hematócrito em anemias não renais; nesta última, níveis de EPO 1 000 vezes o normal foram reportados.²

A anemia pode ser secundária à inflamação, artrite reumatóide, neoplasmas, e doença renal crónica. As “anemias secundárias” podem ser, contudo, pelo menos parcialmente, atribuíveis à subprodução de EPO.⁴

A não produção de EPO suficiente é responsável pelas anemias moderadas a severas observadas na doença renal em fase terminal. A produção de EPO diminuída é atribuída à destruição de locais de produção renal; o sensor de oxigénio renal pode também ser afectado. Os níveis de hormona excedem ligeiramente a faixa de referência, e são inadequados para corrigir a perda sanguínea devido à diálise, vida mais curta das células vermelhas, deficiência de folato e ferro, transferência debilitada de ferro para as células progenitoras eritróides, e outras dificuldades que esses doentes enfrentam. Os doentes anéfricos demonstram especialmente baixos níveis de EPO. Alguns doentes com insuficiência renal crónica, contudo, apresentam hematócritos normais ou anemias menos graves e EPO elevada. Alguns desses doentes têm rins císticos ou hepatite viral; no último, o aumento de EPO pode ser resultado da produção hepática aumentada.

A superprodução de células vermelhas é chamada de policitemia. As policitemias podem também ser divididas em duas categorias dependendo se a condição é primária ou secundária aos níveis de EPO. Na policitemia vera, os níveis de EPO são diminuídos e a eritropoiese é primária para e independente da estimulação pela EPO. A variação nos valores de EPO pode chegar a ser 10 vezes superior em diferentes doentes com o mesmo hematócrito.

Algumas outras condições podem ser caracterizadas pela perda de controlo da realimentação de concentração de oxigénio sobre a produção de EPO, provocando um aumento de níveis de EPO.³ Estas incluem carcinomas da célula renal, no qual 2% dos doentes apresentam eritrocitose, e algumas lesões renais benignas, como quistos renais múltiplos ou simples, estenose arterial renal e anormalidades microvasculares. Além disso, cerca de 10% de doentes com transplantes renais desenvolvem eritrocitose, algumas vezes do rim doente autólogo.

A policitemia secundária é caracterizada por níveis elevados de EPO que levam ao aumento da massa das células vermelhas. Esta condição pode resultar de uma variedade de factores, incluindo hemoglobina defeituosa, tabagismo, fibrose pulmonar, insuficiência cardíaca, tumores e cálculos renais.⁵

Ao avaliar a EPO para o diagnóstico diferencial de policitemias, a sobreposição possível dos valores para a eritrocitose secundária ou para a policitemia vera com aqueles na faixa de referência deve ser considerada.³

Princípio do Procedimento

A EPO IMMULITE/IMMULITE 1000 é um ensaio imunométrico em fase sólida quimioluminescente.

Ciclos de incubação: 2 x 30 minutos.

Colheita

Existem vários relatórios de variação diurna de eritropoietina nas referências de literatura.⁷⁻⁹ É importante colher amostras à mesma hora do dia. As amostras matinais colhidas entre 7:30 da manhã e 12:00 (meio-dia) têm sido recomendadas.

Uma variação nos valores pode ocorrer se a amostra não for coagulada à temperatura ambiente (15–28°C).

Como EDTA teria um efeito significativo nos resultados, não deve ser usado como anticoagulante.

Recomenda-se o uso de uma ultra centrífuga para clarear amostras lipémicas.

Amostras hemolisadas ou totalmente contaminadas podem causar resultados errados.

A centrifugação de amostras de soro antes da formação completa do coágulo pode resultar na presença de fibrina. Para prevenir resultados errados devido à presença de fibrina, certifique-se que a formação do coágulo foi completa antes da centrifugação das amostras. Algumas amostras, em especial as de doentes que recebem terapia anticoagulante podem requerer um maior tempo de formação do coágulo.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes. IMMULITE / IMMULITE 1000 EPO não foram ainda testados com todas as possíveis variações originadas pelos tipos de tubos. Consultar a secção Tipos de Amostras Alternativas para obter detalhes sobre os tubos que foram testados.

Volume de amostra: 100 µL de soro ou plasma heparinizado. (Cuvete de amostra deve conter um mínimo de 250 µL a mais que o volume total exigido.)

Estabilidade: 7 dias a 2–8°C, ou 2 meses a –20°C. Evite ciclos repetidos de congelamento/descongelamento.

Precauções

Para uso de diagnóstico *in vitro*.

Reagentes: Manter a 2–8 °C. Elimine de acordo com as leis aplicáveis.

Manipule com as devidas precauções todos os materiais capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias primas obtidas de soro humano foram testadas, dando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2;

para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e para os anticorpos do vírus da hepatite C.

Azida de sódio foi adicionada como conservante; para evitar acumulações de azidas metálicas explosivas em canalizações de cobre e chumbo, os reagentes devem ser rejeitados no esgoto apenas se estiverem diluídos e forem lavados com grandes volumes de água.

Substrato quimioluminescente: Evite contaminação e exposição à luz directa (ver bula do substrato).

Água: Use água destilada ou desionizada.

Materiais fornecidos

Os componentes formam um conjunto uno e indivisível. Os códigos de barras no interior das caixas são necessárias para o ensaio.

Unidades de Teste de EPO (LEP1)

Cada unidade rotulada por código de barras contém uma pérola revestida com anti-ligante derivado de estreptavidina. Estável até a data de validade a 2–8°C.

LKEPZ: 50 unidades.

LKEP1: 100 unidades.

Deixe que as saquetas de Unidade de Teste fiquem à temperatura ambiente antes de as abrir. Abra cortando pela ranhura superior, mantendo o fecho intacto. Sele novamente as saquetas para proteger contra a humidade.

Embalagens de reagentes de EPO (LEPA, LEPB)

Com código de barras. **LEPA:** 7,5 mL de anticorpo monoclonal murino marcado com ligando anti-EPO, com conservante.

LEPB: 7,5 mL de fosfatase alcalina conjugada a anticorpo policlonal de cabra anti-EPO em tampão, com conservante. Armazene tapado e refrigerado: Estável até à data de validade a 2–8°C.

Recomenda-se a utilização até 30 dias após aberto quando armazenado de acordo com as indicações.

LKEPZ: 1 conjunto. **LKEP1:** 1 conjunto.

Ajustes EPO (LEPL, LEPH)

Dois frascos (nível alto e baixo) de EPO de recombinante humano, liofilizado numa matriz de soro não humano, com conservante. Pelo menos 30 minutos

antes do uso: reconstitua cada frasco com **4,0 mL** de água destilada ou desionizada. Misture por inversão ou movimentos lentos até o material liofilizado dissolver completamente. Estável, após a reconstituição, durante 30 dias a 2–8°C, ou por 6 meses (aliquotado) a –20°C.

LKEPZ: 1 conjunto. **LKEP1:** 1 conjunto.

Componentes do kit fornecidos separadamente

Diluyente de amostra para EPO (LEPZ)

Para a diluição manual de amostras de doentes. Um frasco (25 mL) de matriz de soro de origem não humana, com conservante. Estável, após a abertura, durante 30 dias a 2–8°C, ou por 6 meses (aliquotado) a –20°C.

LSUBX: Substrato quimioluminescente

LPWS2: Solução de lavagem

LKPM: Kit de limpeza do pipetador

LCHx-y: Suportes de cuvetes de amostra (com código de barras)

LSCP: Cuvetes de amostra (descartáveis)

LSCC: Tampa de cuvetes de amostra

(opcional)

LEPCM: Módulo de Controlo de EPO de três níveis

Também necessário :

Pipetas de transferência de amostra; água destilada ou desionizada; controlos.

Procedimento de doseamento

Têr em atenção que para obter um desempenho óptimo, é importante efectuar todos os procedimentos de manutenção de rotina conforme definido no Manual de Operador do IMMULITE ou IMMULITE 1000.

Ver o Manual do Operador do IMMULITE ou IMMULITE 1000 para: preparação, setup, diluições, ajustes, procedimento do ensaio e controlo de qualidade.

Confirme a presença da esfera em cada Unidade de Teste antes de a colocar no sistema.

Repare que as Embalagens de Reagente A e B devem ser colocadas no carrossel dos reagentes para executar este doseamento.

Cada suporte de cuvette de amostra pode ser seguido por quatro unidades de teste.

Intervalo entre ajustes aconselhável:
2 semanas.

Amostras de controlo de qualidade:
utilize controlos ou "pools" com, pelo menos, dois níveis (alto e baixo) de EPO.

Valores de Referência

Um estudo executado com o kit de EPO IMMULITE da DPC em 167 voluntários de laboratório aparentemente saudáveis resultou num valor de média de 10,5 mIU/ml, e um percentil de 95% de 20,1 mIU/ml e uma faixa de variação absolutamente 3,7 mIU/ml e 29,5 mIU/ml.

Deve-se ter cuidado na interpretação dos resultados de EPO em doentes com doenças para além da anemia. Em doentes com eritrocitose devido a hipóxia não compensada, a EPO imunoreactiva do soro é elevada; naqueles com hipóxia compensada, o nível plasmático de EPO imunoreactivo situa-se, habitualmente, dentro da faixa do normal, e em doentes com policitémia vera, a EPO imunoreactiva plasmática é tanto normal como baixo. Assim, enquanto um nível de EPO plasmática elevada sugere que a eritrocitose é um fenómeno secundário e um nível de EPO baixo suporta a possibilidade de eritropoiese autónoma, um nível de EPO de soro normal não exclui nem a hipóxia nem a produção de EPO autónoma como a causa da eritrocitose.

Considere estes limites apenas como *directrizes*. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência.

Limitações

Variações nos resultados de EPO têm sido observadas na presença de autoanticorpos.

Nenhuma droga tem testada apresentou interferência no doseamento.

Os resultados deste doseamento deverão ser usados juntamente com a informação disponível das avaliações clínicas e outros procedimentos diagnósticos.

Como os resultados obtidos com qualquer doseamento de EPO podem diferir significativamente de qualquer outro, recomenda-se que qualquer teste em série realizado no mesmo doente no

decorrer do tempo, seja realizado com o mesmo teste de EPO.

Níveis de EPO inferiores ao previsto têm sido observados com anemias associadas com as seguintes condições: artrite reumatóide, síndrome da imunodeficiência adquirida, cancro, colite ulcerosa, doença das células falciformes e em recém-nascidos prematuros.

Após o transplante da medula óssea alogénica, uma resposta comprometida de eritropoietina pode retardar a recuperação da eritropoietina.

Doentes com hipergamaglobulinémia associada com mieloma múltiplo ou doença de Waldenstrom tem enfraquecida a produção de eritropoietina em relação à concentração de hemoglobina, e isto tem sido associado ao aumento da viscosidade do plasma.

Os níveis de EPO de pessoas que moram em altitudes elevadas, com eritrocitose, podem baixar rapidamente para o normal após voltar à baixa altitude.

Os anticorpos heterófilicos no soro humano podem reagir com as imunoglobulinas presentes no ensaio, causando interferência com os imunoensaios in vitro. [Ver Boscatto LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Amostras de doentes expostas em rotina a produtos ou soros de animais podem demonstrar este tipo de interferência, potencial causador de resultados anómalos. Estes reagentes foram formulados para minimizar o risco de interferência, contudo podem ocorrer potenciais interações entre soros (raros) e componentes do teste. Para fins de diagnóstico, os resultados obtidos neste ensaio devem ser sempre analisados em combinação com o exame clínico, história de medicação do doente e outros achados que possam correlacionar.

Características do Ensaio

Consulte Tabelas e Gráficos para dados *representativos* do desempenho do doseamento. Os resultados são apresentados em mIU/mL.

Calibração: Até 200 mIU/mL (WHO 2nd IRP 67/343).

Sensibilidade Analítica: 1,0 mIU/mL.

Efeito Hook de Alta Dose:
Nenhum até 50 000 mIU/mL.

Precisão: As amostras foram processadas em duplicado num período de 20 dias, dois ensaios por dia, perfazendo um total de 40 ensaios e 80 réplicas. (Consulte a tabela "Precisão".)

Linearidade: As amostras foram doseadas sob várias diluições. (Consulte a tabela "Linearidade" para dados representativos.)

Recuperação: As amostras foram adicionadas na relação de 1 para 19 com duas soluções EPO (85 e 777 mIU/ml) antes do doseamento. (Vêr tabela de "Recuperação" para dados representativos.)

Especificidade: O doseamento é específico para EPO. (Vêr tabela de "Especificidade".)

Tipo de amostra alternativa As amostras ($n = 22$) foram extraídas para tubos de contenção a vácuo EDTA, heparinizados e simples. Zona de trabalho: de aproximadamente 5,1 a 196 mIU/mL. O plasma EDTA não é recomendado no procedimento.

(Heparin) = 0,99 (Soro) + 0,7 mIU/mL
 $r = 0,997$

(EDTA) = 0,88 (Soro) - 3,4 mIU/mL
 $r = 0,991$

Médias:
77,7 mIU/mL (Soro)
77,6 mIU/mL (Heparin)
64,7 mIU/mL (EDTA)

Como EDTA teria um efeito significativo nos resultados, não deve ser usado como anticoagulante.

Bilirrubina: A presença de bilirrubina conjugada e não conjugada em concentrações até 200 mg/L não tem efeito no procedimento dentro da precisão do ensaio.

Hemolise: A presença de hemoglobina em concentrações até 384 mg/dL pode causar um decréscimo dos valores. (Vêr tabela de "Hemolysis".)

Lipemia: A presença de trigliceridos em concentrações até 3 000 mg/dL não tem efeito nos resultados, dentro da precisão do ensaio.

Comparação de métodos: O doseamento foi comparado com um doseamento imunoradiométrico disponível

comercialmente para EPO (Kit A) em 130 amostras de soro endógeno (Zona de concentração: de aproximadamente 2,5 a 200 mIU/mL. Consulte o gráfico.)
Regressão linear:

(IML) = 0,85 (Kit A) + 3,8 mIU/mL
 $r = 0,978$

Médias:
41 mIU/mL (IMMULITE)
44 mIU/mL (Kit A)

Assistência Técnica:

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

Fabricado pela EURO/DPC Ltd. de acordo com o Sistema de Qualidade registado segundo a norma ISO 13485:2003.

EURO/DPC LTD

Glyn Rhonwy
Llanberis, Gwynedd LL55 4EL
United Kingdom

DPC®

Diagnostic Products Corporation
Corporate Offices
5210 Pacific Concourse Drive
Los Angeles, CA 90045-6900
USA

2006-09-07

PILKEP - 7



EC REP DPC Biermann GmbH
61231 Bad Nauheim
Germany
+49 -6032-994-00