

 IMMULITE[®] 2000

EPO

DPC[®]

IMMULITE® 2000 EPO

English

Intended Use: For *in vitro* diagnostic use with the IMMULITE 2000 Analyzer — for the quantitative measurement of erythropoietin (EPO) in serum or heparinized plasma, as an aid in the diagnosis of anemias and polycythemias.

Catalog Number: **L2KEP2** (200 tests), **L2KEP6** (600 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 2000 EPO is a solid-phase, chemiluminescent immunometric assay.

Incubation Cycles: 2 × 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 2000 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.

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. Labels on the inside box are needed for the assay.

EPO Bead Pack (L2EP12)

With barcode. 200 beads, coated with anti-ligand derived from streptavidin. Stable at 2–8°C until expiration date. **L2KEP2:** 1 pack. **L2KEP6:** 3 packs.

EPO Reagent Wedge (L2EPA2)

With barcode. 11.5 mL ligand-labeled murine monoclonal anti-EPO antibody, with preservative. 11.5 mL alkaline phosphatase (bovine calf intestine) conjugated to goat polyclonal anti-EPO antibody, in buffer, with preservative. Stable at 2–8°C until expiration date. **L2KEP2:** 1 wedge. **L2KEP6:** 3 wedges.

Before use, tear off the top of the label at the perforations, without damaging the barcode. Remove the foil seal from the top of wedge; snap the sliding cover down into the ramps on the reagent lid.

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.

L2KEP2: 1 set. **L2KEP6:** 2 sets.

Before making an adjustment, place the appropriate Aliquot Labels (supplied with the kit) on test tubes so that the barcodes can be read by the on-board reader.

Kit Components Supplied Separately**Multi-Diluent 2 (L2M2Z, L2M2Z4)**

For the on-board dilution of patient samples. One vial, concentrated (ready-to-use), nonhuman protein/buffer matrix, with preservative. Storage: 30 days (after opening) at 2–8°C or 6 months (aliquotted) at –20°C.

L2M2Z: 25 mL **L2M2Z4:** 55 mL

Barcode labels are provided for use with the diluent. Before use, place an appropriate label on a 16 × 100 mm test tube, so that the barcodes can be read by the on-board reader.

L2M2Z: 3 labels. **L2M2Z4:** 5 labels.

L2SUBM: Chemiluminescent Substrate

L2PWSM: Probe Wash

L2KPM: Probe Cleaning Kit

LRXT: Reaction Tubes (disposable)

L2ZT: 250 Sample Diluent Test Tubes (16 × 100 mm)

L2ZC: 250 Sample Diluent Tube Caps

LEPCM: Tri-level EPO Control Module

Also Required

Distilled or deionized water; test tubes; controls.

Assay Procedure

Note that for optimal performance, it is important to perform all routine maintenance procedures as defined in the IMMULITE 2000 Operator's Manual

See the IMMULITE 2000 Operator's Manual for: preparation, setup, dilutions, adjustment, assay and quality control procedures.

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 2000 EPO on 167 apparently healthy laboratory volunteers yielded a median of 10.2 mIU/mL, a 95th percentile of 19.6 mIU/mL and an absolute range of 3.7 to 31.5 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.

EDTA plasma should not be used as a sample type. (See Alternate Sample Type section).

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 >100,000 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 three EPO solutions (25, 50 and 75 mIU/mL) were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

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

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 512 mg/dL may cause a slight 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.

Alternate Sample Type: To determine if samples other than serum samples are suitable for analysis in the IMMULITE 2000 EPO procedure, blood was collected from 22 volunteers into plain, heparinized, EDTA and Becton Dickinson SST[®] vacutainer tubes. Some of the matched sample types were supplemented with EPO in order to obtain results throughout the calibration range of the assay. All samples were analyzed by

the IMMULITE 2000 EPO procedure, with the following results:

(Heparin) = 1.02 (Serum) – 0.7 mIU/mL
r = 0.996

(EDTA) = 0.61 (Serum) – 1.1 mIU/mL
r = 0.986

(SST®) = 0.97 (Serum) + 0.4 mIU/mL
r = 0.998

Means:

81.5 mIU/mL (Serum)
82.6 mIU/mL (Heparin)
48.7 mIU/mL (EDTA)
79.6 mIU/mL (SST®)

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

Method Comparison: The assay was compared to DPC's IMMULITE EPO on 160 samples. (Concentration range: approximately up to 200 mIU/mL. See graph.) By linear regression:

(IML 2000) = 1.02 (IML) + 0.1 mIU/mL
r = 0.992

Means:

34.3 mIU/mL (IMMULITE 2000)
33.4 mIU/mL (IMMULITE)

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	
		SD ⁴	CV ⁵	SD	CV	
1	4.1	0.23	5.6%	0.24	5.9%	
2	12.3	0.71	5.8%	0.78	6.3%	
3	16.0	0.75	4.7%	0.79	4.9%	
4	31.7	1.5	4.7%	1.8	5.7%	
5	64.0	3.2	5.0%	3.6	5.6%	
6	126	6.4	5.1%	6.9	5.5%	
7	184	9.5	5.2%	10.7	5.8%	

Specificity

Compound ¹	µg/mL Added ²	% Cross-reactivity ³
Human Serum Albumin	60	ND
α-1 Antitrypsin	100	0.2%
α-Acid Glycoprotein	100	ND
Human α-Globulin	100	ND
Human Transferrin (iron-saturated)	100	ND
Human Transferrin (nonsaturated)	100	ND

ND: Not detectable.⁴

Linearity (mIU/mL)

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	8 in 8 ⁵	39.2	—	—
	4 in 8	17.7	19.6	90%
	2 in 8	8.3	9.8	85%
	1 in 8	4.3	4.9	88%
2	8 in 8	58.7	—	—
	4 in 8	26.5	29.4	90%
	2 in 8	13.1	14.7	89%
	1 in 8	6.3	7.3	86%
3	8 in 8	83.8	—	—
	4 in 8	39.2	41.9	94%
	2 in 8	19.8	21.0	94%
	1 in 8	9.7	10.5	92%
4	8 in 8	104	—	—
	4 in 8	49.8	52	96%
	2 in 8	24.2	26	93%
	1 in 8	12.0	13	92%
5	8 in 8	112	—	—
	4 in 8	53.4	56	95%
	2 in 8	26.5	28	95%
	1 in 8	13.3	14	95%
6	8 in 8	132	—	—
	4 in 8	64.8	66.0	98%
	2 in 8	33.1	33.0	100%
	1 in 8	15.2	16.5	92%

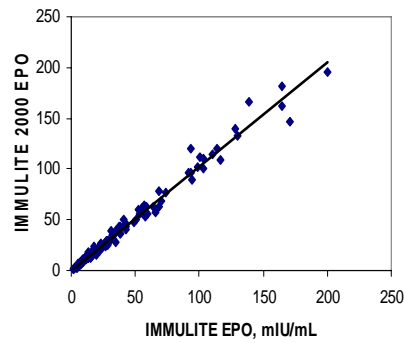
Recovery (mIU/mL)

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	—	9.8	—	—
	A	38.0	34.3	111%
	B	65.2	59.3	110%
	C	83.2	84.3	99%
2	—	13.6	—	—
	A	37.1	37.9	98%
	B	71.2	62.9	113%
	C	97.1	87.9	110%
3	—	26.7	—	—
	A	51.8	50.3	103%
	B	82.3	75.3	109%
	C	112	100	112%
4	—	36.1	—	—
	A	64.1	59.3	108%
	B	87.2	84.3	105%
	C	127	109	117%
5	—	58.5	—	—
	A	78.0	80.6	97%
	B	106	106	100%
	C	143	131	109%
6	—	98.9	—	—
	A	122	119	103%
	B	150	144	104%
	C	186	169	110%

Hemolysis

	Unspiked ²	Hemoglobin ¹		
		128 mg/dL	256 mg/dL	512 mg/dL
1	59	55	53	51
2	92	88	88	81
3	128	122	117	121
4	145	144	140	132

Method Comparison



$$(IML\ 2000) = 1.02 (IML) + 0.1\ mIU/mL$$
$$r = 0.992$$

Deutsch. Precision: ¹Intra-Assay, ²Gesamt, ³Mittelwert, ⁴S (Standardabweichung), ⁵CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Lösung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E. **Specificity:** ¹Verbindung, ²zugewetzte Menge, ³% Kreuzreaktivität, ⁴NN: Nicht nachweisbar. **Effect of Hemolysis:** ¹Hämoglobin, ²Ohne Zugabe von. **Method Comparison:** EPO: EPO.

Español. Precision: ¹Intraensayo, ²Total, ³Media, ⁴DS, ⁵CV. **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, ³% Reacción cruzada, ⁴ND: no detectable. **Effect of Hemolysis:** ¹Hemoglobina, ²Sin añadir. **Method Comparison:** EPO: EPO.

Français. Precision: ¹Intraessai, ²Total, ³Moyenne, ⁴SD, ⁵CV. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A, ⁵8 dans 8. **Recovery:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composé, ²ajouté, ³Réaction croisée%, ⁴ND: non détectable. **Effect of Hemolysis:** ¹Hémoglobine, ²Non chargés. **Method Comparison:** EPO: EPO.

Italiano. Precision: ¹Intra-serie, ²Totale, ³Media, ⁴SD (Deviazione Standard), ⁵CV (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, ³Percentuale di Crossreattività, ⁴ND: non determinabile. **Effect of Hemolysis:** ¹Emoglobina, ²Semplice. **Method Comparison:** EPO: EPO.

Português. Precision: ¹Entre-ensaios, ²Total, ³Média, ⁴Desvio padrão, ⁵Coeficiente 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, ³Percentagem de reação cruzada, ⁴ND: não detectável. **Effect of Hemolysis:** ¹Hemoglobina, ²Não adicionada. **Method Comparison:** EPO: EPO.

Deutsch

EPO – IMMULITE 2000

Anwendung: Für in-vitro-diagnostische Tests mit dem Analysegerät IMMULITE 2000 – für die quantitative Bestimmung von Erythropoetin (EPO) im Serum oder Heparin-Plasma, als Hilfestellung bei der Diagnose einer Anämie und Polyzythämie.

Artikelnummern: **L2KEP2** (200 Tests), **L2KEP6** (600 Tests)

Testcode: **EPO** Farbe: **hellgrün**

Klinische Relevanz

Das Erythropoetin (EPO) ist ein mit komplexen Kohlenhydratketten glykosyliertes Protein mit 165 Aminosäuren. 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,^{2,3} während bei Erwachsenen 90% der Synthese in der Niere erfolgt. 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 Sauerstoffsensor 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. 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 verschieden 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 2000 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 Fibringerinnseln 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 2000 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.

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 Bestandteile der Testpackung sind aufeinander abgestimmt. Die Barcode-Aufkleber auf der Innenverpackung werden zur Testdurchführung gebraucht.

EPO Kugel Container (L2EP12)

Der barcodierte Kugel-Container enthält 200 Kugeln, beschichtet mit anti-ligand hergeleitet von Streptavidin. Bei 2–8°C bis zum Ablaufdatum haltbar.

L2KEP2: 1 Container.

L2KEP6: 3 Container.

EPO Reagenzbehälter (L2EPA2)

Mit Barcode. 11,5 ml ligand-markierte monoklonale anti-EPO Antikörper (Maus), mit Konservierungsmitteln. 11,5 ml alkalische Phosphatase (Rinderkalbsdarm) konjugiert mit polyklonalen anti-EPO Antikörper (Ziege), in einer Puffermatrix, mit Konservierungsmitteln. Bei 2–8°C bis zum Ablaufdatum haltbar.

L2KEP2: 1 Behälter.

L2KEP6: 3 Behälter.

Vor Gebrauch den Aufkleber an der Perforation abreißen, ohne dabei die Barcodierung zu beschädigen. Die Folie von der Oberseite des Containers entfernen. Die Folie von der Oberseite des Containers entfernen. Den Schiebedeckel nach unten in die Führung des Reagenziendeckels einrasten lassen.

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.

L2KEP2: 1 Set. **L2KEP6:** 2 Sets.

Vor der Kalibrierung die entsprechenden Aufkleber (dem Kit beiliegend) auf Glasröhrchen kleben, so daß die Barcodes vom Barcodereader des Systems gelesen werden können.

Separat erhältliche Testsystem-Komponenten

Multidiluent 2 (L2M2Z, L2M2Z4)

Zum automatischen Verdünnen der Patientenproben. Eine Flasche, konzentriert (gebrauchsfertig), aus einer nichthumanen Protein/Puffer-Matrix, mit Konservierungsmitteln. Lagerung: 30 Tage (nach dem Öffnen) bei 2–8°C oder 6 Monate (aliquotiert) bei –20°C.

L2M2Z: 25 ml **L2M2Z4:** 55 ml

Zum Einsatz des Verdünnungsreagens (Diluents) werden Barcode Etiketten mitgeliefert. Vor Verwendung ein entsprechendes Etikett so auf ein 16 x 100 mm Teströhrchen kleben, dass es vom eingebauten Barcode Reader gelesen werden kann.

L2M2Z: 3 Etiketten. **L2M2Z4:** 5 Etiketten.

L2SUBM: Chemilumineszenz-Substratmodul

L2PWSM: Waschmodul

L2KPM: Reinigungsmodul

LRXT: (Einmal-) Reaktionsgefäße

L2ZT: 250 Teströhrchen (16 x 100 mm) für die Probenverdünnung

L2ZC: 250 Röhrchenverschlüsse für die Probenverdünnung

LEPCM: EPO Kontrollmodul in drei Konzentrationen.

Ebenfalls benötigt
Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser;
Teströhrchen; Kontrollen.

Testdurchführung

Für eine optimale Funktion des Gerätes ist unbedingt zu beachten, dass die Wartungen, wie im IMMULITE 2000-

Handbuch beschrieben, regelmäßig durchgeführt werden.

Hinweise zur Vorbereitung, täglichen Inbetriebnahme des Systems, der Kalibrierung sowie Verfahren zur Test- und Qualitätskontrolle entnehmen Sie bitte dem IMMULITE 2000-Handbuch.

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 2000 EPO mit 167 gesunden Laborfreiwilligen zeigte einen Median von 10,2 mIU/ml, eine 95% Perzentile von 19,6 mIU/ml und einen Absolutbereich von 3,7 mIU/ml bis 31,5 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.

EDTA Plasma sollte nicht als Probenotyp verwendet werden. (Siehe Abschnitt Alternativer Probenotyp).

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 >100 000 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 drei EPO-Lösungen (25, 50 und 75 mIU/ml) 1:19 versetzt. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Recovery“.)

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

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: Hämoglobin hat in Konzentrationen bis zu 512 mg/dl kann eine Erniedrigung der Werte verursachen (siehe Tabelle „Hämolyse“).

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.

Alternativer Probenotyp: Um zu ermitteln, ob andere Proben als Serumproben im IMMULITE 2000 EPO Verfahren verwendet werden können, wurde Blut von 22 Freiwilligen in unbeschichtete, Heparin, EDTA und Becton Dickinson SST[®] Vacutainer Röhrchen abgenommen. Manche der angepassten Probenotypen wurden zusätzlich mit EPO abgenommen,

um Ergebnisse innerhalb des Kalibrationsbereiches für den Assay zu bekommen. Alle Proben wurden mit dem IMMULITE 2000 EPO Verfahren, mit den folgenden Ergebnissen getestet:

(Heparin) = 1,02 (Serum) – 0,7 mIU/ml
r = 0,996

(EDTA) = 0,61 (Serum) – 1,1 mIU/ml
r = 0,986

(SST[®]) = 0,97 (Serum) + 0,4 mIU/ml
r = 0,998

Mittelwerte:

81,5 mIU/ml (Serum)
82,6 mIU/ml (Heparin)
48,7 mIU/ml (EDTA)
79,6 mIU/ml (SST[®])

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

Methodenvergleich: Der Assay wurde mit dem DPC IMMULITE EPO an 160 Proben verglichen.

(Konzentrationsbereich: ca. bis 200 mIU/ml. Siehe Grafik.) Durch lineare Regression:

(IML 2000) = 1,02 (IML) + 0,1 mIU/ml
r = 0,992

Mittelwerte:

34,3 mIU/ml (IMMULITE 2000)
33,4 mIU/ml (IMMULITE)

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 el diagnóstico *in vitro* con el Analizador IMMULITE 2000 — para la medición cuantitativa de eritropoyetina (EPO) en suero o plasma heparinizado, como una ayuda en el diagnóstico de anemias y policitemias.

Referencia: **L2KEP2** (200 tests),
L2KEP6 (600 tests)

Código del Test: **EPO**
Código de 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 anéfríticos 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 2000 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 2000 no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos. Para obtener detalles sobre los tipos de tubos que se han analizado, consulte la sección de Tipos de Muestras Alternativas.

Volumen requerido: 100 µl suero y plasma heparinizado.

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 eliminación, lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitución de residuos de

azidas metálicas, potencialmente explosivas, en las cañerías 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.

Cartucho de bolas de reacción de EPO (L2EP12)

Con código de barras. 200 bolas de reacción, recubiertas de anti-ligando derivado de estreptavidina. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad.

L2KEP2: 1 cartucho

L2KEP6: 3 cartuchos

Vial de reactivo de EPO (L2EPA2)

Con códigos de barras. 11,5 ml Anticuerpo monoclonal murino anti-EPO marcado con ligando, con conservante. 11,5 ml Fosfatasa alcalina conjugada con anticuerpo policlonal anti-EPO de cabra en solución tampón, con conservante. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad.

L2KEP2: 1 vial. **L2KEP6:** 3 viales.

Antes de usar, cortar la parte superior de la etiqueta en la perforación, sin dañar el código de barras. Quitar el precinto del orificio del vial; encajar la cubierta deslizante en las rampas de la tapa del reactivo.

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 (alícuotados) a –20°C.

L2KEP2: 1 juego. **L2KEP6:** 2 juegos.

Antes de hacer un ajuste, colocar las etiquetas a las alícuotas apropiadas (suministradas con el kit) sobre tubos de

ensayo, de forma tal que los códigos de barras puedan ser leídos por el lector.

Componentes del kit que se suministran por separado

Multidiluyente 2 (L2M2Z L2M2Z4)

Para la dilución de las muestras del paciente que van a analizarse. Un vial de matriz de suero no humano, libre de EPO, lista para usar, con azida sódica de conservante. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrirse, o hasta 6 meses (alícuotados) a –20°C.

L2M2Z: 25 ml **L2M2Z4:** 55 ml

Se suministran etiquetas con códigos de barras para usarse con este diluyente. Antes de uso, colocar la etiqueta con el código de barras en un tubo de ensayo de 16 x 100 mm, así los códigos de barras pueden ser identificados por el lector del instrumento.

L2M2Z: 3 etiquetas. **L2M2Z4:** 5 etiquetas.

L2SUBM: Substrato quimioluminiscente

L2PWSM: Lavado de sonda

L2KPM: Kit de limpieza de sonda

LRXT: Tubos de reacción (desechables)

L2ZT: 250 Tubos De Prueba Del Diluyente De la Muestra (16 x 100 mm)

L2ZC: 250 Casquillos Del Tubo Del Diluyente De la Muestra

LEPCM: Módulo de control EPO de tres niveles

También necesarios

Agua destilada o desionizada; tubos de ensayo; 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 2000.

Consulte el Manual del operador de IMMULITE 2000 para: la preparación, instalación, dilución, ajuste, ensayo y procedimientos de control de calidad.

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 10,2 mIU/ml, un 95% percentil de 19,6 mIU/ml y un intervalo absoluto de 3,7 mIU/ml a 31,5 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.

Plasma EDTA no debe ser usado como un tipo de muestra (Ver sección tipo de muestra).

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, consulte las tablas y los gráficos. Los resultados se expresan en mIU/ml.

Intervalo 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 >100 000 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 tres soluciones (25, 50 y 75 mIU/ml). (Véase la tabla "Recuperación" para resultados representativos).

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

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.

Hemólisis: La presencia de hemoglobina, en concentraciones hasta 512 mg/dl, puede causar una bajada de los valores. (Véase la tabla "Hemólisis".)

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.

Tipo de Muestra Alternativa: Para verificar el efecto del uso de tipos alternativos de muestras, se recogió sangre de 22 voluntarios en tubos vacutainer Becton Dickinson SST[®] vacíos o heparinizados. Se cargaron volúmenes iguales de las muestras con varias concentraciones de EPO, para obtener valores distintos a lo largo de la curva de calibración de la técnica, y se ensayaron posteriormente con el kit de EPO de IMMULITE 2000, con los siguientes resultados:

(Heparina) = 1,02 (Suero) – 0,7 mIU/ml
r = 0,996

(EDTA) = 0,61 (Suero) – 1,1 mIU/ml
r = 0,986

(SST[®]) = 0,97 (Suero) + 0,4 mIU/ml
r = 0,998

Medias:
81,5 mIU/ml (Suero)
82,6 mIU/ml (Heparina)
48,7 mIU/ml (EDTA)
79,6 mIU/ml (SST[®])

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

Comparación de los métodos: Se comparó el ensayo con un kit de EPO IMMULITE de DPC en 160 muestras. (Intervalo de concentración: aproximadamente de hasta 200 mIU/ml. Véase el gráfico.) Por regresión lineal:

$(IML\ 2000) = 1,02 (IML) + 0,1\ mIU/ml$
 $r = 0,992$

Medias:
34,3 mIU/ml (IMMULITE 2000)
33,4 mIU/ml (IMMULITE)

Asistencia técnica

Póngase en contacto con el distribuidor nacional.

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

Français

IMMULITE 2000 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 2000, et constitue une aide au diagnostic des anémies et polyglobulies.

Référence catalogue :
L2KEP2 (200 tests), **L2KEP6** (600 tests)

Code produit : **EPO**
Code couleur : **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 premier régulateur 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 fœtus 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 médulla 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 hématoците normal ou une anémie moins sévère 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 hématoците.

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 2000 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 littérature.⁷⁻⁹ 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 2000 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.

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-HCV 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 les contaminations 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 l'intérieur du coffret sont nécessaires au dosage.

Cartouche de billes EPO (L2EP12)
Avec code-barres. 200 billes revêtues d'un anti-ligand dérivé de la streptavidine. Stable à +2/ +8 °C jusqu'à la date de péremption.

L2KEP2: 1 cartouche.

L2KEP6: 3 cartouches.

Cartouche à réactif EPO (L2EPA2)

Avec code-barres. 11,5 ml d' anticorps monoclonal murin anti-EPO marqué par un ligand, avec conservateur. 11,5 ml d'anticorps polyclonal de chèvre anti-EPO conjugué à de la phosphatase alcaline (intestins de veaux), dans un tampon, avec conservateur. Stable à +2/ +8 °C jusqu'à la date de péremption.

L2KEP2: 1 cartouche.

L2KEP6: 3 cartouches.

Avant l'emploi, retirer la partie supérieure de l'étiquette au niveau des perforations en ayant soin de ne pas endommager le code-barres. Retirer le film protecteur situé sur la partie supérieure de la cartouche-réactif ; insérer le couvercle coulissant entre les glissières sur le dessus de la cartouche-réactif.

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.

L2KEP2: 1 jeu. **L2KEP6:** 2 jeux.

Avant de procéder à un ajustement, placer les étiquettes correspondant à l'aliquot (fournies avec le coffret) sur des tubes en verre de sorte que les code-barres soient lisibles par le lecteur.

Composants du coffret fournis séparément

Multi-diluant 2 (L2M2Z, L2M2Z4)

Pour la dilution automatisée par l'appareil des échantillons cliniques. Un flacon de matrice protéine non-humaine/tampon, concentrée (prête à l'emploi), avec conservateur. Conservation: 30 jours (après ouverture) à +2-8°C ou 6 mois (aliquoté) à -20°C.

L2M2Z: 25 ml **L2M2Z4:** 55 ml

Les étiquettes code-barres sont fournies avec le Diluant. Avant utilisation, placer l'étiquette appropriée sur un tube de

16 x 100 mm de façon que le code-barre puisse être lu par le lecteur de l'appareil.

L2M2Z: 3 étiquettes.

L2M2Z4: 5 étiquettes.

L2SUBM : Substrat chimiluminescent

L2PWSM : Solution de lavage

L2KPM : Coffret de décontamination de l'aiguille de prélèvement

LRXT : Godets réactionnels (jetables)

L2ZT : 250 Tubes À essai De Diluant échantillon (16 x 100 mm)

L2ZC : 250 Bouchons pour tubes de diluants

LEPCM : Contrôle EPO, à trois niveaux de concentration.

Egalement requis
Eau distillée ou désionisée ; Tubes;
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 IMMULITE 2000.

Se reporter au manuel d'utilisation de l'IMMULITE 2000 pour : la préparation, le démarrage du système, le dilution, les ajustements, le dosage et les procédures de contrôle de qualité.

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 10,2 mUI/ml, un 95^{ème} percentile de 19,6 mUI/ml et un domaine absolu allant de 3,7 mUI/ml à 31,5 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.

Le plasma EDTA ne doit pas être utilisé comme échantillon. (Voir le chapitre Autres types d'échantillons).

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 rares 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 >100 000 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 trois solutions d'EPO (25, 50 et 75 mUI/ml). (Voir le tableau « Recovery » pour des données représentatives.)

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

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 peut entraîner une baisse des valeurs si la concentration ne dépasse pas 512 mg/dl. (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.

Autres types d'échantillons: Afin de déterminer si des échantillons autres que sériques conviennent à des analyses avec la procédure IMMULITE 2000 EPO, du sang de 22 volontaires a été prélevé sur tubes secs, héparinés, EDTA et tubes vacutainers Becton Dickinson SST®. Il a été ajouté de l'EPO à certains de ces différents échantillons afin d'obtenir des résultats inclus dans le domaine de mesure du dosage. Tous les échantillons ont été analysés avec la procédure IMMULITE 2000 EPO, et ont donné les résultats suivants:

(Héparine) = 1,02 (Sérum) – 0,7 mUI/ml
r = 0,996

(EDTA) = 0,61 (Sérum) – 1,1 mUI/ml
r = 0,986

(SST®) = 0,97 (Sérum) + 0,4 mUI/ml
r = 0,998

Moyennes :
81,5 mUI/ml (Sérum)
82,6 mUI/ml (Héparine)
48,7 mUI/ml (EDTA)
79,6 mUI/ml (SST®)

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

Comparaison de méthodes: Le test a été comparé au dosage IMMULITE EPO de DPC sur 160 échantillons. (intervalle de concentrations : environ jusqu'à 200 mUI/ml. Voir graphique.) Par régression linéaire :

(IML 2000) = 1,02 (IML) + 0,1 mUI/ml
r = 0,992

Moyennes :
34,3 mUI/ml (IMMULITE 2000)
33,4 mUI/ml (IMMULITE)

Assistance technique

Contactez votre distributeur national. 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

IMMULITE 2000 EPO

Uso: Ad uso diagnostico *in vitro* con l'analizzatore IMMULITE 2000 — per la misurazione quantitativa dell'Eritropoietina (EPO) nel siero o nel plasma eparinizzato, quale ausilio nella diagnosi delle anemie e delle policitemie.

Codice: **L2KEP2** (200 test),
L2KEP6 (600 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, attraverso il fegato ed anche 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 presenza 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 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. 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'infezione, 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 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 difettosa, 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

Procedura del Dosaggio

IMMULITE 2000 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).

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

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

Campioni emolizzati o grossolamente contaminati possono produrre risultati errati.

La centrifugazione dei campioni di 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 2000 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.

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

Avvertenze e precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare a 2–8°C. Scartare in conformità alle leggi applicabili.

Seguire le precauzioni universali, e maneggiare tutti i componenti come se fossero capaci di trasmettere agenti infettivi. Sono stati analizzati i materiali di sorgente dal sangue umano e sono stati trovati non reattivi per sifilide; per anticorpi ad HIV 1 e 2; per l'antigeno superficiale dell'epatite B; e per anticorpi all'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 costituiscono un unico set. Le etichette all'interno della confezione sono necessarie per eseguire i dosaggi.

Contenitore di Sferette EPO (L2EP12)

Con codice a barre. 200 biglie, coattate con anti-ligando with derivato da streptavidina. Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza.

L2KEP2: 1 confezione.

L2KEP6: 3 confezioni.

Porta Reagente EPO (L2EPA2)

Con codice a barre. 11,5 mL di un anticorpo monoclonale anti-EPO murino marcato con ligando, con conservanti. 11,5 mL di fosfatasi alcalina (intestino di vitello) conjugata con un anticorpo policlonale anti-EPO di capra, in un tampone, con conservanti. Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza.

L2KEP2: 1 Porta Reagente.

L2KEP6: 3 Porta Reagenti.

Prima dell'utilizzo rimuovere la parte superiore dell'etichetta lungo la perforazione senza danneggiare il codice a barre. Togliere il foglio protettivo dalla parte superiore del flacone. Far scattare nella corretta posizione il coperchio scorrevole lungo le guide del coperchio del reagente.

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 capovolgendo la miscela finchè 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.

L2KEP2: 1 set. **L2KEP6:** 2 set.

Prima di ricalibrare collocare le etichette giuste (fornite col kit) sulle provette delle aliquote cosicchè i codici a barre possano essere registrati dal lettore.

Componenti del kit forniti separatamente

Multidiluyente 2 (L2M2Z, L2M2Z4)

Per la diluizione interna dei campioni dei pazienti. Un flacone, contenente una matrice/tampone proteica non-umana concentrata (pronta all'uso), con conservanti. Conservazione: 30 giorni (dopo l'apertura) a 2–8°C o per 6 mesi (aliquotato) a –20°C.

L2M2Z: 25 mL **L2M2Z4:** 55 mL

Vengono fornite le provette da utilizzarsi con il diluente. Prima dell'utilizzo, collocare un'etichetta appropriata su una provetta 16 × 100 mm cosicchè i codici a barre possano essere letti dal lettore interno.

L2M2Z: 3 etichette. **L2M2Z4:** 5 etichette.

L2SUBM: Substrato Chemiluminescente

L2PWSM: Tampone di lavaggio dell'Ago

L2KPM: Kit di Pulizia dell'Ago

LRXT: Tubi di Reazione (monouso)

L2ZT: 250 Provette (16 × 100 mm) per

Diluente del Campione

L2ZC: 250 Tappini per Provette per

Diluente del Campione

LEPCM: Controllo EPO a tre livelli

Materiali richiesti

Acqua distillata o deionizzata; Provette; controlli.

Procedura del Dosaggio

Attenzione: per prestazioni ottimali, è importante effettuare le procedure di manutenzione di routine cosicchè

definito nel Manuale dell'Operatore IMMULITE 2000.

Vedi Manuale dell'Operatore IMMULITE 2000 per: preparazione, messa a punto, diluizione, calibrazione, dosaggio e procedure di controllo di qualità.

Intervallo di Calibrazione Consigliato:
2 settimane.

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

Valori attesi

Uno studio effettuato con il kit DPC IMMULITE 2000 EPO su 167 volontari di laboratorio in apparente buono stato di salute ha prodotto una media di 10,2 mIU/ml, un 95° percentile di 19,6 mIU/ml ed un range assoluto da 3,7 mIU/ml a 31,5 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 i propri range di riferimento.

Limiti

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

Nessun farmaco è stato dosato per verificare le interferenze nel dosaggio.

I risultati di questo dosaggio devono essere utilizzati con le altre informazioni cliniche e diagnostiche disponibili.

Poiché 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 eritropoietica ostacolata può ritardare il recupero dell'eritropoietina.

In pazienti con ipergammaglobulinemia associata a mieloma multiplo o a 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 in persone che abitano ad altitudini elevate con eritrocitosi possono diminuire rapidamente a livelli normali dopo essere tornati a livello del mare.

Non deve essere utilizzato plasma EDTA. (Vedi sezione "Tipo di Campione Alternativo").

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 con questo dosaggio devono sempre essere utilizzati unitamente all'esame clinico, all'anamnesi del paziente e ad altre indagini di laboratorio.

Prestazioni del Dosaggio

Vedi tabelle e grafici per dati *rappresentativi* delle prestazioni del

dosaggio. I risultati sono espressi in mIU/mL.

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

Sensibilità analitica: 1,0 mIU/mL

Effetto Gancio a dosi elevate: Nessuno fino a >100 000 mIU/mL.

Precisione: I campioni sono stati elaborati in doppio in 20 giorni, due sedute al giorno, per un totale di 40 sedute ed 80 replicati. (Vedi tabella "Precision")

Linearità: I campioni sono stati dosati a varie diluizioni. (Vedi tabella "Linearity" per dati rappresentativi.)

Recupero: Sono stati dosati campioni diluiti 1:19 con tre soluzioni (25, 50 e 75 mIU/mL) di EPO (Vedi tabella "Recovery" per dati rappresentativi).

Specificità: L'anticorpo è molto specifico per l'EPO. (Vedi tabella "Specificity".)

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 512 mg/dL può causare un decremento dei valori. (Vedi tabella "Emolisi".)

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.

Tipo di Campione Alternativo: Per determinare se i campioni diversi dal siero siano idonei per l'analisi con il dosaggio IMMULITE 2000 EPO, è stato effettuato un prelievo di sangue a 22 volontari in provette semplici, eparinizzate, vacutained EDTA e Becton Dickinson SST.[®] Ad alcuni dei campioni misti è stata aggiunta EPO per ottenere risultati lungo tutto il range della calibrazione del dosaggio. Tutti i campioni sono stati dosati con il Dosaggio IMMULITE 2000 EPO con i seguenti risultati:

(Eparina) = 1,02 (Siero) - 0,7 mIU/mL
r = 0,996

(EDTA) = 0,61 (Siero) - 1,1 mIU/mL
r = 0,986

(SST[®]) = 0,97 (Siero) + 0,4 mIU/mL
r = 0,998

Valore medio:
81,5 mIU/mL (Siero)
82,6 mIU/mL (Eparina)
48,7 mIU/mL (EDTA)
79,6 mIU/mL (SST[®])

Poiché l'EDTA ha un effetto significativo sui risultati, non utilizzarlo come anticoagulante.

Comparazione di Metodi: Il dosaggio è stato comparato al dosaggio o DPC IMMULITE EPO su 160 campioni. (Range di concentrazione: circa fino a 200 mIU/mL. Vedi grafico.) Mediante regressione lineare:

(IML 2000) = 1,02 (IML) + 0,1 mIU/mL
r = 0,992

Valore medio:
34,3 mIU/mL (IMMULITE 2000)
33,4 mIU/mL (IMMULITE)

Assistenza Tecnica

All'estero: Contattare il proprio distributore 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* com o Analisador IMMULITE 2000 — para o doseamento quantitativo da eritropoietina (EPO) em soro ou plasma heparinizado, como auxiliar no diagnóstico de anemias e policitémias.

Números de catálogo:
L2KEP2 (200 testes),
L2KEP6 (600 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 correcção 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 2000 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 lipêmicas.

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 2000 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.

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, revelando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2; para o antigénio 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 alumínio, 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 deionizada.

Materiais Fornecidos

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

Embalagem de pérolas de EPO (L2EP12)

Com código de barras. 200 pérolas, revestidas com anti-ligante derivado da estreptovidina. Estável até a data de validade a 2–8°C.

L2KEP2: 1 embalagem.

L2KEP6: 3 embalagens.

Embalagem de Reagente de EPO (L2EPA2)

Com código de barras. 11,5 mL de ligante-marcado com anticorpo monoclonal de murino anti-EPO, com conservante. 11,5 mL de fosfatase alcalina (intestino de bezerro) conjugada com anticorpo policlonal de cabra anti-EPO, em tampão, com conservante. Estável até a data de validade a 2–8°C.
L2KEP2: 1 embalagem.
L2KEP6: 3 embalagens.

Antes de utilizar, retire a etiqueta de protecção da tampa deslizante; levante a tampa, remova o remanescente da etiqueta com o cuidado de não danificar o código de barras. Remova o selo de alumínio do topo da embalagem, encaixe a tampa deslizante nas ranhuras e verifique se a tampa desliza.

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.
L2KEP2: 1 conjunto.
L2KEP6: 2 conjuntos.

Antes de realizar qualquer ajuste, coloque as etiquetas da alíquota apropriadas (fornecidas com o "kit") nos tubos de amostra de forma a que os códigos de barras possam ser lidos pelo dispositivo de leitura do aparelho.

Componentes do kit fornecidos separadamente

Multidiluyente 2 (L2M2Z, L2M2Z4)

Para a diluição no aparelho de amostras de doentes. Um frasco, concentrado (pronto a usar), de matriz proteica não humana tamponada, com conservante. Armazenar: 30 dias (após abertura) a 2–8°C ou 6 meses (aliquotado) a –20°C.
L2M2Z: 25 mL **L2M2Z4:** 55 mL

Etiquetas de código de barras são fornecidas para usar com o diluyente. Antes de usar, colocar a etiqueta

apropriada num tubo de teste (16 x 100 mm) de modo a que o código de barras possa ser lido pelo dispositivo de leitura do aparelho.

L2M2Z: 3 etiquetas. **L2M2Z4:** 5 etiquetas.

L2SUBM: Substrato quiomiluminescente

L2PWSM: Solução de lavagem

L2KPM: Kit de limpeza do pipetador

LRXT: Tubos de reacção (descartáveis)

L2ZT: 250 Tubos de diluyente da amostra (16 x 100 mm)

L2ZC: 250 Tampas para tubos de diluyente da amostra

LEPCM: Módulo de Controlo de EPO de três níveis

Também necessário

Água destilada ou desionizada; tubos de amostra; controlos.

Procedimento de doseamento

Ter 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 2000.

Consulte o Manual do Operador de IMMULITE 2000 para instruções sobre preparação, diluição, ajuste, doseamento e procedimentos de controlo de qualidade.

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 10,2 mIU/ml, e um percentil de 95% de 19,6 mIU/ml e uma faixa de variação absolutamente 3,7 mIU/ml e 31,5 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 policitemia 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 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 enfraquecido 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.

Não deve ser usado plasma colhido com EDTA como amostra. (Ver a secção Tipo de amostra alternativa).

Os anticorpos heterófilicos no soro humano podem reagir com as imunoglobulinas presentes no ensaio, causando interferência com os imunoenaios in vitro. [Ver Boscato 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 interacções 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 >100 000 mIU/mL.

Precisão: 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 três soluções (25, 50 e 75 mIU/ml) antes do doseamento. (Vêr tabela de "Recuperação" para dados representativos.)

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

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.

Hemólise: A presença de hemoglobina em concentrações até 512 mg/dL pode ambos possuir um efeito, causando uma depressão dos valores. (Ver tabela de "Hemólise".)

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

Tipo de amostra alternativa: Para determinar se outro tipo de amostras além de soro podem ser usadas no procedimento do IMMULITE 2000 EPO, foram colhidas amostras de sangue de 22 voluntários em tubos secos, com EDTA, heparinizados e de vácuo Becton Dickinson SST®. Algumas das amostras foram adicionadas com EPO para se obterem resultados ao longo da gama de calibração do ensaio. Todas as amostras foram analisadas com o IMMULITE 2000 EPO, obtendo-se os resultados seguintes:

(Heparina) = 1,02 (Soro) - 0,7 mIU/mL
r = 0,996

(EDTA) = 0,61 (Soro) - 1,1 mIU/mL
r = 0,986

(SST®) = 0,97 (Soro) + 0,4 mIU/mL
r = 0,998

Médias:

81,5 mIU/mL (Soro)
82,6 mIU/mL (Heparina)
48,7 mIU/mL (EDTA)
79,6 mIU/mL (SST®)

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

Comparação de Métodos: O ensaio foi comparado com o IMMULITE EPO da DPC em 160 amostras. (Zona de trabalho: aproximadamente até 200 mIU/mL. Consulte o gráfico.) Regressão linear:

(IML 2000) = 1,02 (IML) + 0,1 mIU/mL
r = 0,992

Médias:

34,3 mIU/mL (IMMULITE 2000)
33,4 mIU/mL (IMMULITE)

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

2006-09-08

PIL2KEP - 8



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