

EPO [Erythropoietin] ELISA

Katalog-Nr. 7025

Spezifischer Assay zur quantitativen Bestimmung des Erythropoietins in humanem Serum

Januar 2005



I. VERWENDUNGSZWECK

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

II. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Erythropoietin (EPO) ist ein stark glykosiliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 30 000 - 34 000 Dalton. Humanes EPO ist ein Polypeptid aus 165 Aminosäuren und 4 Zuckerseitenketten, von denen eine O-glykosidisch und drei N-glykosidisch mit dem Protein verbunden sind.¹ Rekombinantes EPO (r-EPO) ist ein geeigneter Ersatz für das körpereigene Protein zur Verwendung im Immunoassay.² EPO-Serumspiegel sind abhängig von der Rate, mit der das Protein hergestellt und wieder eliminiert wird. 90% des EPO werden in den peritubulären Zellen der erwachsenen Niere als Antwort auf eine Abnahme der Gewebsoxygenierung produziert.^{3,4} Es gibt Hinweise darauf, dass das Protein auf diesen Zellen, welches den Grad der Sauerstoffsättigung des Bluts feststellt, eine Häm-Einheit enthält.⁵ Während Sauerstoffpartialdruck (pO₂) des Plasmas und Hämatokritwerte sinken, steigt die EPO-Konzentration.⁶ Eine normalerweise bestehende inverse Korrelation zwischen EPO-Serumspiegeln und Erythrozytenmasse ist ebenfalls beschrieben worden.⁷

Die Quantifizierung des Erythropoietin-Serumspiegels dient als diagnostisches Hilfsmittel bei der Ursachenbestimmung von Anämien bzw. Erythrozytosen. Aplastische Anämien, hämolytische Anämien und Anämien aufgrund von Eisenmangel führen alle zu erhöhten Konzentrationen von EPO im Serum. Dagegen sind EPO-Spiegel von Patienten mit sekundärer Anämie aufgrund von Niereninsuffizienz und anderen Erkrankungen wie AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) für den Grad der Anämie im Allgemeinen unangemessen niedrig. Dies liegt vermutlich an einer herabgesetzten Fähigkeit der erkrankten Niere, ausreichende Mengen EPO zu produzieren.⁸ Niedrige EPO-Spiegel können ein frühes Warnsignal für die Abstoßung eines Nierentransplantats sein.¹⁰ EPO kann auch zur Überwachung von AIDS-Patienten unter Zidovudin-Therapie (AZT) eingesetzt werden. Erhöhte EPO-Werte bestätigen, dass eine mit einer AZT-Therapie einhergehende Anämie durch Hypoplasie oder Aplasie der Erythrozyten verursacht wird.¹⁰

Polycythaemia rubra vera, bzw. primäre Erythrozytose (eine Vermehrung der Erythrozytenmasse), resultiert aus einer nicht-stimulierten Überproduktion von Erythrozyten. Durch die Zunahme an Hämoglobin kommt es zu einer verminderten EPO-Produktion, die in einem EPO-Serumspiegel unterhalb der normalen Werte resultiert.⁹ Die sekundäre Polyzythämie, die ebenfalls durch einen Anstieg der Erythrozytenmasse im Blut gekennzeichnet ist, tritt als physiologische Antwort auf erhöhte Konzentrationen von zirkulierendem EPO durch Gewebshypoxie auf. Die Hypoxie kann durch Lungenfibrose, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, längere Aufenthalte in großen Höhen, anomales Hämoglobin oder medikamentöse Therapie verursacht sein.¹⁰ Einige Tumore produzieren EPO. In solchen Fällen kann EPO als Tumor-Marker zur Therapieeffizienz-Kontrolle eingesetzt werden.

III. TESTPRINZIP

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

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

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

IV. TESTKIT-KOMPONENTEN

Testkit - Komponenten	Bezeichnung	Menge
RGT 1 = Reagenz 1	Der biotinylierte EPO-Antikörper [maus monoklonales Antihuman-EPO] enthält ProcClin 300 als Konservierungsmittel.	1 x 3,5 ml
RGT 2 = Reagenz 2	Peroxidase- (Enzym) gekoppelter EPO-Antikörper [monoklonaler Maus-Antikörper gegen h-EPO]	1 x 3,5 ml
RGT A = ELISA Reagenz A	ELISA Waschkonzentrat [saliner Puffer mit Detergenz, Ciprofloxacinhydrochlorid als Konservierungsmittel]	1 x 30 ml
RGT B = ELISA Reagenz B	TMB-Substratlösung [Tetramethylbenzidin]	1 x 20 ml
SOLN = Stopplösung	ELISA Stopplösung [1 N Schwefelsäure]	1 x 20 ml
PLA = Mikrotiterplatte	Eine Halterung mit Streptavidin-beschichteten Streifen	12 Streifen à 8 Vertiefungen
CAL = Kalibratoren A: 0 mU/ml B: Genaue C: Konzentrationen D: auf E: Flaschenetiketten F:	Lyophilisiertes synthetisches h-EPO. Der lyophilisierte Nicht-Nullkalibrator ist eine gepufferte Proteinlösung und alle anderen Kalibratoren bestehen aus synthetischem h-EPO (1-165) in einer gepufferten Proteinlösung. Diese Standards wurden gegen den „WHO Erythropoietin 1 st International Standard [rh-EPO] (87/684)“ kalibriert. Jeder Kalibrator enthält das Konservierungsmittel Ciprofloxacinhydrochlorid.	1 x 4 ml für den Nullkalibrator 1 x 2 ml für alle anderen Kalibratoren
CTRL = Kontrollen 1 & 2 Genaue Bereiche auf Flaschenetiketten	Lyophilisiert, 2 Level. Synthetisches h-EPO (1-165) in einer gepufferten Proteinlösung. Jede Kontrolle enthält das Konservierungsmittel Ciprofloxacinhydrochlorid.	1 x 2 ml je Level

WEITERE ERFORDERLICHE, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN UND GERÄTE

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

V. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur in der *in-vitro* Diagnostik einzusetzen.

Material mit möglicher Gesundheitsgefährdung

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

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

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

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

VI. PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

Die Bestimmung von EPO ist mit Humanserum durchzuführen. Um die Proben in Doppelbestimmung zu testen, sind 400 µl Humanserum erforderlich. Es wird empfohlen, die Proben zwischen 7.30 und 12.00 Uhr mittags zu entnehmen, da in der Literatur ein zirkadianer Rhythmus für das Erythropoietin beschrieben wird.^{11,12} Vollblut in einem Reagenzglas ohne Antikoagulanzen sammeln. Blut, wenn möglich, bei einer Temperatur von 2 - 8 °C gerinnen lassen. In Serumproben, die bei Raumtemperatur (22° - 28 °C) geronnen, wurde ein Absinken der im Radioimmunoassay ermittelten EPO-Werte um ca. 30 % gegenüber einer Gerinnung bei starker Kühlung beschrieben.¹³ Das Serum ist anschließend, vorzugsweise in einer Kühlzentrifuge, sofort zu trennen und bei -15°C oder darunter zu lagern. Serumproben können bei 2 - 8 °C bis zu 24 Stunden gelagert werden. Auf -15°C tiefgefrorene Serumproben sind bis zu 12 Monate stabil. Proben in einem Gefrierschrank ohne automatische Abtauung lagern. Wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren der Proben ist zu vermeiden. Für eine Langzeitlagerung der Proben wird empfohlen, diese vor dem Einfrieren in Reagenzröhrchen oder Flaschen zu aliquotieren. Vor der Verwendung alle Proben auf Raumtemperatur (22° - 28 °C) bringen. Durch vorsichtiges Überkopfdrehen oder Schwenken mischen. Extrem hämolytische oder lipämische Proben sind zu vermeiden.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

Alle Testkit-Komponenten bei 2-8 °C lagern mit Ausnahme des Waschkonzentrats

1. Alle Reagenzien mit Ausnahme der Kalibratoren, Testkit-Kontrollen und dem Waschkonzentrat sind gebrauchsfertig. Alle Reagenzien bei 2 - 8 °C lagern mit Ausnahme des Waschkonzentrats, das bis zum Zeitpunkt der Verdünnung bei Raumtemperatur (22° - 28 °C) aufzubewahren ist, um eine Niederschlagsbildung zu vermeiden.
2. Den Nicht-Nullkalibrator (Kalibrator A) mit 4 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren und mischen. Jeden der Nicht-Nullkalibratoren (Kalibrator B bis F) und die Testkit-Kontrollen 1 und 2 mit 2 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren und mischen. Flaschen 10 Minuten ruhen lassen. Anschließend durch vorsichtiges Überkopfdrehen gründlich mischen, um eine vollständige Rekonstitution sicherzustellen. **Kalibratoren und Kontrollen sind nach Rekonstitution sobald wie möglich zu verwenden. Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-15 °C).** Standards und Kontrollen sind 6 Wochen nach Rekonstitution bei -15 °C stabil und können maximal dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, wenn die im Abschnitt „Verfahrenstechnische Hinweise“ gegebenen Empfehlungen beachtet werden.
3. **ELISA Reagenz A** (Waschkonzentrat): Inhalt gründlich mischen. Ist eine Niederschlagsbildung im Waschkonzentrat auf Grund einer Lagerung bei niedrigen Temperaturen wie 4 °C eingetreten, ist das Präzipitat durch Platzieren des Gefäßes in ein Wasserbad oder einen Laborofen bei 37 °C und zusätzliches Schwenken und Rühren aufzulösen. Waschkonzentrat (30 ml) zu 570 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser hinzufügen und mischen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Raumtemperatur 90 Tage stabil.

VIII. TESTVERFAHREN

1. Eine für alle sechs (6) Kalibratoren, A – F der EPO-KALIBRATOREN [genaue Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten vermerkt], Kontrollen und Patientenproben ausreichende Anzahl **Streptavidin-beschichteter Streifen** in die Halterung einsetzen.
2. **200 µl** der Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die dafür vorgesehenen oder gekennzeichneten Vertiefungen pipettieren. **Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-15 °C).**
3. **25 µl** des Reagenz 1 (biotinylierter Antikörper) in jede der Vertiefungen, die bereits die Kalibratoren, Kontrollen und Proben enthalten, pipettieren bzw. dispensieren.
4. **25 µl** des Reagenz 2 (enzymgekoppelter Antikörper) in dieselben Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Mikrotiterplatte kräftig gegen einen festen Gegenstand, z. B. einen Stift, klopfen, um eine gründliche Vermischung der Proben und Reagenzien zu erreichen. Um eine vollständige Vermischung sicherzustellen, verbleibende drei der vier Seiten der Mikrotiterplatte ebenfalls mindestens jeweils 5 Mal gegen das Objekt klopfen. Verschütten des Gemischs vermeiden. Mikrotiterplatte(n) mit Aluminiumfolie oder einem Deckel abdecken, um Licht fernzuhalten. Platte **2 Stunden ±15 Minuten** bei Raumtemperatur (22°-28°C) auf einem **Orbitalschüttler oder Rotator** bei 170 ± 10 U/min inkubieren.
5. Flüssigkeit zunächst vollständig absaugen. Anschließend jede der Vertiefungen fünf (5) Mal mit dem verdünnten Waschpuffer (mit Reagenz A erstellt) in

einem automatischen Waschgerät waschen/absaugen. Die Waschpuffer-Dispensationsmenge ist auf 0,35 ml je Vertiefung einzustellen.

6. **150 µl** des **ELISA Reagenz B** (TMB-Substratlösung) in jede der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Mikrotiterplatte, wie in Schritt (4) beschrieben, gegen festes Objekt klopfen.
7. Mikrotiterplatte(n) mit einer entsprechenden Abdeckung zur Vermeidung von Lichtestrahlung **30 ±5 Minuten** bei Raumtemperatur (22°-28°C) auf einem **Orbitalschüttler oder Rotator** bei 170 ± 10 U/min inkubieren.
8. **100 µl** der Stopplösung in jede der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Mikrotiterplatte, wie in Schritt (4) beschrieben, gegen festes Objekt klopfen. Verschütten des Gemischs vermeiden.
9. Innerhalb von 10 Minuten Absorption der Lösung in den Vertiefungen bei **450 nm** im Mikrotiterplatten-Lesegerät gegen 250 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser messen. Anschließend **noch einmal** bei einer Wellenlänge von **405 nm** gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser messen.
Hinweis: Die zweite Messung erfolgt, um die analytische Gültigkeit der Kalibrationskurve auf den höchsten Kalibratorwert (ca. 350 mU/ml) auszudehnen. (Die genaue Konzentration ist auf den Flaschenetiketten vermerkt und variiert von Charge zu Charge leicht.) Somit können Patientenproben mit EPO-Werten > als der vorletzte [zweithöchste] Kalibrator, d.h. Kalibrator E, gegen eine Kalibrationskurve aus Messwerten bis zu der Konzentration, die dem höchsten Kalibrator entspricht, quantifiziert werden. Gemessen wird bei 405 nm, in sicherem Abstand von der Wellenlänge der maximalen Absorption. Patienten- und Kontrollproben sind bei EPO-Konzentrationen bis zur Konzentration von Kalibrator E bei 450 nm zu messen. EPO-Konzentrationen oberhalb von Kalibrator E werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.
10. Unter Verwendung der im vorherigen Schritt ermittelten endgültigen Absorptionswerte können zwei Kalibrationskurven (eine bei 405 nm, die zweite bei 450 nm) mittels kubischer Splines, 4-Parameter Logistik oder Punkt-zu-Punkt-Interpolation zur Quantifizierung der EPO-Konzentration erstellt werden.

VERFAHRENSTECHNISCHE HINWEISE

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

IX. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Manuell

1. Erstellen einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Kalibrationskurve) für die Messung bei 450 nm unter Verwendung der ersten fünf im Testkit enthaltenen Kalibratoren, d. h. Kalibrator A, B, C, D und E. Erstellen einer zweiten Dosis-Wirkungs-Kurve für die Messung bei 405 nm unter Verwendung der Kalibratoren A, D, E und F.
2. Jedem Kalibrator die auf dem Fläschchen in mU/ml angegebene Konzentration zuweisen. Daten der Kalibrationskurve auf Millimeterpapier übertragen, wobei die Konzentration auf der X-Achse gegen die entsprechende Absorptionseinheit auf der Y-Achse aufzutragen ist.
3. Zwei nebeneinander liegende Punkte sind durch eine Gerade zu verbinden. Dieser mathematische Algorithmus wird als lineare Interpolation bezeichnet. Die Probenkonzentration ist durch Feststellung der Absorptionseinheit auf der

Y-Achse und des zugehörigen Konzentrationswerts auf der X-Achse zu ermitteln. Patienten- und Kontrollproben sind bei EPO-Konzentrationen bis zum zweitletzten [zweithöchsten] Kalibrator, Kalibrator E, bei 450 nm zu messen. EPO-Konzentrationen oberhalb der Konzentration des zweitletzten Kalibrators (im Beispiel unten mit 120 mU/ml angegeben) werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.

Automatisch

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

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

Mikrotiterplatten - Vertiefung	1.Messung Absorptionseinheit	2.Messung Absorptionseinheit	Mittlere Absorptionseinheit	EPO mU/ml	EPO mU/ml - Anzugebendes Ergebnis
Kalibrator A	0,019	0,021	0,020		0
Kalibrator B	0,122	0,114	0,118		7,5
Kalibrator C	0,200	0,207	0,204		18,2
Kalibrator D	0,411	0,423	0,417		41
Kalibrator E	1,308	1,263	1,286		120
Kontrolle 1	0,176	0,178	0,177	15,7	15,7
Kontrolle 2	1,395	1,493	1,444	>120	*
Patientenprobe 1	0,115	0,125	0,120	9,6	9,6
Patientenprobe 2	0,414	0,420	0,417	40,4	40,4
Patientenprobe 3	3,314	---	3,314	>120	*

* Da die gemessene Konzentration > die Konzentration von Kalibrator E ist (hier: 120 mU/ml), sollten die bei 405 nm ermittelten Werte angegeben werden, die nachfolgend unter **Beispieldaten bei 405 nm** aufgeführt sind.

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

Mikrotiterplatten - Vertiefung	1.Messung Absorptionseinheit	2.Messung Absorptionseinheit	Mittlere Absorptionseinheit	EPO mU/ml	EPO mU/ml - Anzugebendes Ergebnis
Kalibrator A	0,003	0,007	0,005		0
Kalibrator B	0,122	0,127	0,125		41
Kalibrator D	0,405	0,389	0,397		120
Kalibrator F	1,331	1,257	1,294		494
Kontrolle 1	0,052	0,056	0,054	< 120	¶
Kontrolle 2	0,427	0,460	0,444	133	133
Patientenprobe 1	0,036	0,038	0,037	< 120	¶
Patientenprobe 2	0,125	0,128	0,127	< 120	¶
Patientenprobe 3	1,035	---	1,035	300	300

¶ Für Proben mit einem Messwert < die Konzentration von Kalibrator E (hier: 120 mU/ml), sollten die bei 450 nm ermittelten Werte angegeben werden, wie sie oben in der Tabelle **Beispieldaten bei 450 nm** aufgeführt sind. Durch diese Vorgehensweise wird die bestmögliche Sensitivität erreicht.

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

X. QUALITÄTSKONTROLLE

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

XI. GRENZEN DES VERFAHRENS

Wie jeder als diagnostisches Hilfsmittel verwendete Analyt sind EPO-Ergebnisse sorgfältig unter Berücksichtigung des gesamten klinischen Erscheinungsbildes des Patienten und weiteren unterstützenden diagnostischen Tests zu interpretieren. Gereinigte IgG-Proteine derselben Spezies, für die die Fangantikörper und markierten Antikörper gewonnen wurden, wurden zusätzlich zu einem kommerziellen blockierenden heterophilen Antikörper in die Reagenzien gegeben, um die Anzahl heterophiler Antikörper zu minimieren.¹⁴ Es gibt jedoch keine Gewährleistung dafür,

dass die Interferenzen durch heterophile Antikörper vollständig beseitigt wurden. Es wird daher empfohlen, wenigstens drei Verdünnungen aller erhöhten und/oder möglicherweise positiven Ergebnisse zu testen, um Unparallelitäten im Vergleich zu den Referenzstandards festzustellen.¹⁵

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

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

Niedrigere EPO-Spiegel als erwartet wurden bei Anämien im Rahmen folgender Erkrankungen festgestellt: rheumatoide Arthritis, AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome), Krebs und ulzerative Kolitis¹⁷, Sichelzellenanämie sowie bei Frühgeborenen.¹⁸

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

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

Medikamente wurden nicht auf ihre Assay-Interferenz überprüft.

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

XII. ERWARTETE WERTE

Mithilfe des Biomerica ACTH ELISA wurden in den USA bei hundertzwanzig (120) scheinbar gesunden Probanden EPO-Konzentrationen gemessen. Die Proben wurden 61 männlichen und 59 weiblichen Probanden im Alter von 18 bis 96 Jahren entnommen. Es bestehen keine signifikanten statistischen Unterschiede zwischen den für die weiblichen und männlichen Probanden ermittelten Referenzbereichen. In der Literatur wird dieses Ergebnis (die Geschlechtergleichheit bezüglich EPO-Werten) bestätigt.²¹ Darüber hinaus zeigen die EPO-Werte keine signifikante Altersabhängigkeit, mit Ausnahme erhöhter Probenwerte bei Personen im frühen Erwachsenenalter (ungefähr zwischen 22 und 42 Jahren). Die in der NCCLS-Veröffentlichung beschriebene non-parametrische Methode zur Analyse der Referenzwerte („How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory“ (NCCLS Document C28-A, Vol. 15 No. 4) ergab einen **Referenzbereich von 4,3 – 32,9 mU/ml (2,5 – 97,5 Percentile)** für EPO im Serum. Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalwertbereich erstellen.

Patienten mit Erythrozytose aufgrund unkompensierter Hypoxie weisen erhöhte immunreaktive EPO-Serumspiegel auf. Patienten mit kompensierter Hypoxie zeigen üblicherweise immunreaktive EPO-Serumspiegel im Normalbereich. Patienten mit Polyzythämie vera weisen normale oder niedrige immunreaktive EPO-Serumspiegel auf. Während somit ein erhöhter EPO-Serumspiegel auf eine Erythrozytose als sekundäre Erkrankung hinweist und ein niedriger EPO-Spiegel auf das mögliche Vorliegen einer autonomen Erythropoese hindeutet, lassen sich bei normalem EPO-Serumspiegel weder Hypoxie noch autonome EPO-Produktion als Ursache einer Erythrozytose ausschließen.^{20 20}

XIII. LEISTUNGSMERKMALE

Genauigkeit

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

$$\text{Biomerica ELISA} = 0,94 \text{ ELISA Kit} - 0,41 \text{ mU/mL}$$

$$r = 0,989 \quad N = 85$$

Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit bzw. untere Nachweisgrenze dieses Tests ist als der kleinste Wert definiert, der auf Basis des 95%-Vertrauensbereichs vom Nullstandard unterschieden werden kann. Der Biomerica EPO ELISA hat eine berechnete Empfindlichkeit von 1,2 mU/ml. Daher sind Ergebnisse aus Patientenproben unter 1,2 mU/ml als „< 1,2 mU/ml“ im Bericht zu führen.

Präzision und Reproduzierbarkeit

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

Probe	Intra-Assay-Abweichung Mittelwert (mU/mL)	N	Variations - Koeffizient %
A	14,4	22	8,4
B	189	22	4,8

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

Inter-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert (mU/mL)	N	Variations – Koeffizient %
A	20,4	22	8,8
B	183	22	5,1

Spezifität und Querempfindlichkeit

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

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

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

Wiederfindung

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

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

Linearität von Patientenprobenverdünnungen: Parallelität

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

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









„High dose hook-Effekt“

Der Biomerica EPO ELISA zeigt keinen „High dose hook-Effekt“ in Standardverdünner, der mit 200 000 mU/ml EPO versetzt ist. Zusätzlich wurden drei Proben mit bekannten hohen EPO-Werten (1 920 mU/mL, 1 520 mU/mL und 966 mU/ml) ohne Verdünnung getestet. Die abgelesenen Ergebnisse lagen weit über dem höchsten Standard. Proben mit höheren EPO-Spiegeln als die des höchsten Kalibrators sind jedoch zu verdünnen und erneut auf korrekte Werte zu testen.

XIV. LITERATURANGABEN:

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

XV. SYMBOLE

	Lagerungstemperatur
	Stapelcode
	Ablauf
	Hersteller
	Autorisierter Vertreter
	Achtung, Siehe Anweisungen
	Für die <i>in vitro</i> -Diagnostik vorgesehen
	Katalog-Nr.

XVI. BEZUGSNACHWEIS

BESTELLUNGEN: Bestellungen sind zu richten an:
BIOMERICA, INC.
 1533 Monrovia Avenue
 Newport Beach, CA 92663
 U.S.A
 Telefon: +1-(949) 645-2111
 Fax: +1-(949) 722-6674
 Website: www.biomerica.com
 E-Mail: bmra@biomerica.com
 67025-03_ger.doc



gemäß IVDD 98/79/ EC
 MDSS

Burkhardtstraße 1
 30163 Hannover, Deutschland

Januar 2005