

EPO [Érythropoïétine] ELISA

REF 7025

Test quantitatif spécifique de l'érythropoïétine dans le sérum

mai 2018

BIOMERICA

I. APPLICATION

Le test EPO ELISA de Biomerica sert à déterminer la quantité d'érythropoïétine (EPO) dans le sérum humain. Ce dosage sert uniquement à un diagnostic *in vitro* et peut aider à diagnostiquer une anémie ou une polycythémie. En effet, l'avènement de l'utilisation de l'érythropoïétine recombinante comme thérapie biologique pour augmenter la masse des globules rouges a offert la possibilité d'utiliser un dosage de l'érythropoïétine pour prédire et observer la réponse des personnes souffrant d'anémies au traitement par érythropoïétine recombinante.

II. RÉSUMÉ ET EXPLICATION

L'érythropoïétine (EPO) est une protéine fortement glycosylée dont le poids moléculaire varie de 30 000 à 34 000 Daltons. L'EPO humaine est un polypeptide composé de 165 acides aminés, contenant des chaînes d'hydrates de carbone, une par liaison O et trois par liaison N¹. L'EPO recombinante est un excellent substitut de la protéine naturelle dans un dosage immunologique². Les taux d'EPO dans le sérum dépendent du taux de production et du taux de clairance de la protéine. L'EPO est principalement produite (90 %) par les cellules péritubulaires du rein adulte en réponse à une diminution de l'oxygénation des tissus^{3,4}. Il a été prouvé que la protéine présente dans ces cellules qui détecte la saturation d'oxygène dans le sang est un groupement hème⁵. À mesure que la PO₂ du plasma - une fonction de l'hématocrite - diminue, la concentration d'EPO augmente⁶. Certaines observations suggèrent également qu'il existe normalement une corrélation inverse entre les niveaux d'EPO dans le sérum et la masse de globules rouges⁷.

La quantification de la concentration d'érythropoïétine dans le sérum sert de complément au diagnostic quand il s'agit de déterminer la cause d'une anémie ou d'une erythrocytose. L'anémie aplasique, l'anémie hémolytique et l'anémie due à une carence en fer résultent toutes d'une augmentation du taux de l'EPO dans le sérum. Contrairement à ces faits, les taux d'EPO chez les patients souffrant d'une anémie secondaire due à une insuffisance rénale et à d'autres maladies telles que le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) sont, en général, anormalement bas pour ce degré d'anémie. Ceci résulte très probablement de la capacité altérée du rein malade à produire des quantités adéquates d'EPO⁸. Ainsi, de basses concentrations d'EPO peuvent être un signal précoce du rejet d'une greffe de rein¹⁰. L'EPO peut également être prescrite pour suivre l'évolution de la thérapie par Zidovudine (AZT) chez des patients atteints du SIDA. Une augmentation de la concentration d'EPO confirme que l'anémie associée à la thérapie par AZT est due à une hypoplasie des globules rouges ou aplasie¹⁰.

La polycythemia rubra vera ou erythrocytose primaire (une augmentation de la masse des globules rouges) est la conséquence d'une surproduction non stimulée d'érythrocytes. L'augmentation de l'hémoglobine provoque alors la diminution de la production d'EPO, ce qui entraîne des taux d'EPO sérique inférieurs à la normale⁹. Les polycythémies secondaires, caractérisées également par une augmentation de la masse totale de globules rouges, constituent une réponse physiologique aux taux élevés d'EPO circulante dus à une hypoxie tissulaire. L'hypoxie peut être induite par plusieurs facteurs : fibrose pulmonaire, maladie cardiovasculaire, exposition prolongée à des altitudes élevées, formes anormales d'hémoglobine ou traitement avec certains médicaments¹⁰. Certaines tumeurs produisent de l'EPO et dans ces cas, l'hormone peut servir de marqueur de la tumeur pour contrôler l'efficacité du traitement.

III. PRINCIPE DU TEST

Le dosage immunologique EPO de Biomerica est un test ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay] à deux sites (« en sandwich »), servant à mesurer la chaîne d'EPO biologiquement active, constituée de 165 acides aminés. Il utilise deux différents anticorps monoclonaux de souris anti-EPO humaine qui sont appliqués spécifiquement à des régions bien définies de la molécule de l'EPO. L'un des anticorps monoclonaux de souris anti-EPO humaine est biotinylé et l'autre est marqué à la peroxydase de raifort [HRP] pour la détection.

Puits recouvert de Streptavidine - Anti-EPO biotinylé (monoclonal de souris) -- EPO -- Conjugué HRP-Anti-EPO (monoclonal de souris)

Dans ce dosage, les étalons, les contrôles ou les échantillons des patients ont été simultanément incubés avec l'anticorps marqué à l'enzyme et avec un anticorps couplé à la biotine dans un puits à microplaques recouvert de streptavidine. À la fin de l'incubation, les composants libres sont retirés du puits par lavage et l'enzyme liée à la phase solide est incubée avec le substrat, le tétraméthylbenzidine (TMB). On ajoute alors une solution bloquante acide pour arrêter la réaction dont la couleur devient jaune. L'intensité de la couleur jaune est directement proportionnelle à la concentration en EPO

dans l'échantillon. À l'aide des résultats fournis par les étalons, on crée une courbe dose-réponse indiquant l'unité d'absorbance en fonction de la concentration. Les concentrations d'EPO présentes dans les contrôles et les échantillons des patients sont directement déterminées à partir de cette courbe. Les normes de Biomerica, Inc. ont été établies conformément à la norme internationale relative à l'érythropoïétine établie par l'OMS, qui consiste en une EPO dérivée de la technologie de l'ADN recombiné. La norme de référence de l'OMS adoptée était la première norme internationale relative à l'érythropoïétine (87/684).

IV. ÉLÉMENTS DE LA TROUSSE

Éléments de la trousse	Description	Quantité
RGT 1 = Réactif 1	Anticorps anti-EPO biotinylé [anticorps monoclonal de souris anti-EPO humaine] contenant du ProCLin 300, un conservateur	1 x 3,5 ml
RGT 2 = Réactif 2	Anticorps anti-EPO marqué à l'enzyme peroxydase [monoclonal de souris anti-EPO humaine]	1 x 3,5 ml
RGT A = Réactif A ELISA	Solution concentrée de lavage ELISA [saline avec surfactant] contenant la ciprofloxacine comme conservateur	1 x 30 ml
RGT B = Réactif B ELISA	Substrat TMB [tétraméthylbenzidine]	1 x 20 ml
SOLN = Solution bloquante	Solution bloquante ELISA (acide sulfurique 1N)	1 x 20 ml
PLA = Microplaque	Un support avec des bandelettes recouvertes de streptavidine.	12 x 8 bandelettes de puits
CAL = Étalons A : 0 mlU/ml B : C : Voir les D : concentrations E : exactes sur les F : étiquettes des tubes	EPO humaine synthétique lyophilisée. L'étalon zéro lyophilisé est une solution-tampon protéinée, et tous les autres étalons consistent en EPO humaine synthétique (1-165) dans une solution-tampon protéinée. Ces normes ont été établies conformément à la première norme internationale relative à l'érythropoïétine établie par l'OMS [EPO dérivée de la technologie de l'ADN recombiné] (87/684). Chaque étalon contient la ciprofloxacine comme conservateur.	1 x 4 ml pour l'étalon zéro 1 x 2 ml pour tous les autres étalons
CTRL = Contrôles 1 et 2 Voir les limites exactes sur les étiquettes des tubes	Lyophilisés. 2 niveaux. EPO humaine synthétique (1-165) dans une solution-tampon protéinée. Chaque contrôle contient la ciprofloxacine comme conservateur.	1 x 2 ml par niveau

MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Lecteur de microplaques capable de lire à 450 nm et 405 nm.
- Laveur de microplaques [sinon, un lavage manuel est acceptable]
- Pipettes de précision pour 25, 200, 100 et 150 µl.
- (Facultatif) : Distributeur multi-canaux ou à répétition pour 25, 100 et 150 µl
- Minuterie avec une précision de ± 2 minutes.
- Eau distillée ou déminéralisée.
- Agitateurs pour microplaques : Biomerica a mis au point des agitateurs aux diamètres indiqués ci-dessous ; les kits de streptavidine assureront une réponse de performance optimale aux réglages de la vitesse suivants :

Agitateurs pour microplaques	Diamètre d'agitation	Réglage de la vitesse
Orbital	3 mm (0.1118 in)	600 ± 10 tr/min
	19 mm (0.75 in)	170 ± 10 tr/min
Linéaire	25 mm (0.98 in)	170 ± 10 tr/min

V. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour diagnostic *in vitro* seulement.

Bien que les réactifs fournis dans cette trousse aient été spécifiquement composés pour ne pas contenir d'éléments de sang humain, les échantillons de patients humains, qui peuvent être positifs aux anticorps HBsAg, HBcAg ou VIH, doivent impérativement être traités comme des risques biologiques potentiellement infectieux. Les précautions d'usage pour la manipulation d'échantillons de patients non testés doivent être suivies.

La solution bloquante consiste en acide sulfurique 1N. Il s'agit d'un acide corrosif. Quoique dilué, il doit être manipulé avec soin. Il est conseillé de porter des gants, des lunettes de sécurité et des vêtements de protection appropriés pour éviter tout risque de brûlure. Laver immédiatement tout acide déversé avec de grandes quantités d'eau. Ne pas respirer la vapeur et éviter l'inhalation.

Réactif 1 ELISA, anticorps anti-EPO biotinylé, qui contient du ProClin 300 comme conservateur. Éviter tout contact avec ce réactif et porter des gants pendant la manipulation. Nettoyer immédiatement la peau avec du savon et de l'eau en cas de contact accidentel. En cas de contact avec les yeux, les rincer pendant 15. En cas d'ingestion, éviter de vomir et boire de grandes quantités d'eau. Consulter un médecin immédiatement.

Réactif A ELISA, Solution de lavage concentrée et **Étalons et contrôles d'EPO** contiennent de la ciprofloxacine comme conservateur. Ne pas mettre au contact des personnes allergiques aux médicaments à base de Quinoléine. Il est conseillé aux femmes enceintes ou susceptibles de l'être d'éviter tout contact avec la Ciprofloxacine.

Si vous constatez une turbidité dans un quelconque réactif, ne réalisez pas l'analyse et contactez votre fournisseur.

Divers types d'agitateurs dotés de caractéristiques techniques différentes sont disponibles dans le commerce. Au cas où l'agitateur pour microplaques ne se situait pas entre les valeurs indiquées ci-dessus, chaque laboratoire est encouragé à définir ses propres limites optimales.

VI. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Le dosage de l'EPO doit être effectué avec du sérum humain. Il est nécessaire de disposer de 400 µl de sérum humain pour pouvoir doser l'échantillon en double exemplaire. Il est fortement recommandé de recueillir le spécimen entre 7h30 du matin et midi en raison des variations diurnes de l'érythropoïétine documentées.^{11,12} Recueillir le sang entier sans anticoagulant et le laisser coaguler entre 2° et 8°C, si possible. On a relevé que les échantillons de sérum coagulés à température ambiante (22 °C à 28 °C) provoquaient une diminution des taux d'EPO évalués par dosage radio-immunologique d'environ 30 % de coagulation excessive par glace.¹³ Il est alors nécessaire de séparer rapidement le sérum avec une centrifugeuse réfrigérée de préférence et de le conserver à une température de -15 °C ou inférieure. Les échantillons de sérum peuvent être conservés jusqu'à 24 heures entre 2° et 8 °C. S'ils sont congelés à -15 °C, ils restent stables jusqu'à 12 mois. Ne pas conserver les échantillons dans des congélateurs à dégivrage automatique. Éviter la congélation/décongélation répétée des échantillons. Il est conseillé de répartir les échantillons destinés à une longue conservation en volumes égaux dans les éprouvettes ou les fioles avant de les congeler. Avant de les utiliser, amener tous les spécimens à température ambiante (entre 22 °C et 28 °C) et mélanger par retournements ou agiter. Éviter les échantillons fortement hémolysés ou lipémiques.

VII. PRÉPARATION ET CONSERVATION DES RÉACTIFS

Conserver tous les éléments de la trousse entre 2° C et 8° C.

1. Tous les réactifs à l'exception des étalons, des contrôles et de la solution concentrée de lavage sont prêts à l'emploi. Conserver tous les réactifs entre 2° C et 8 °C.
2. Reconstituer la fiole de l'étalon zéro (étalon A) avec 4 ml d'eau distillée ou déminéralisée, puis mélanger. Reconstituer chaque fiole de chacun des étalons distincts de zéro (étalons B à F) et des contrôles 1 et 2 de la trousse avec 2 ml d'eau distillée ou déminéralisée, puis mélanger. Laisser reposer pendant 10 minutes, puis mélanger complètement par retournements pour obtenir une reconstitution totale. **Utiliser les étalons et les contrôles dès que possible après reconstitution. Congeler (à -15 °C) les étalons et contrôles restants dès que possible après emploi.** Les normes et les contrôles demeurent stables à -15 °C pendant 6 semaines après reconstitution et supportent jusqu'à 3 cycles de congélation-décongélation, s'ils sont manipulés conformément aux instructions de la section « Remarques sur les procédures ».
3. **Réactif A ELISA** : Solution concentrée de lavage : Bien mélanger le contenu de la solution concentrée de lavage. Si un précipité apparaît dans cette solution après conservation à basse température, par exemple 4 °C, le dissoudre en plaçant la fiole dans un bain-marie ou un four à 37 °C et en agitant le contenu. Ajouter la solution concentrée de lavage (30 ml) à 570 ml d'eau distillée ou déminéralisée et mélanger. La solution de lavage active diluée est stable pendant 90 jours si elle est conservée à température ambiante.

VIII. PROCÉDURE DE DOSAGE

1. Placer un nombre suffisant de bandelettes recouvertes de streptavidine dans un support pour tester tous les six (6) étalons, ÉTALONS A à F d'EPO (la concentration exacte est indiquée sur l'étiquette de la fiole), les sérums de contrôle qualité et les échantillons de patients. Au minimum, désigner deux puits pour servir de « blancs ». Se référer à l'étape 9 pour la lecture finale de la plaque.
2. Pipeter **200 µl** d'étalons, de contrôles et d'échantillons dans les puits appropriés. **Congeler (à -15 °C) les étalons et contrôles restants dès que possible après emploi.**
3. Ajouter ou administrer 25 µl de Réactif 1 (anticorps biotinylé) dans chaque puits contenant les étalons, les contrôles et les échantillons.
4. Ajouter ou administrer 25 µl de réactif 2 (anticorps marqué à l'enzyme) dans chacun des mêmes puits. Frapper énergiquement la microplaque avec un objet rigide, par exemple un stylo, pour mélanger parfaitement l'échantillon avec les réactifs. Afin de garantir un mélange complètement homogène, répéter l'opération au moins 5 fois sur les trois autres côtés de la microplaque. Éviter soigneusement de déverser le mélange. Recouvrir la plaque ou les plaques d'une feuille d'aluminium ou avec un plateau afin d'éviter l'exposition à la lumière. Les placer sur un **agitateur** ajusté aux réglages recommandés (voir la section IV) pendant **2 heures ± 15 minutes** à température ambiante (22 °C à 28 °C).
5. Aspirer tout le fluide, puis laver ou aspirer chaque puits cinq (5) fois avec la solution de lavage active (préparée avec le Réactif A) dans un laveur de microplaques automatique. Il est recommandé de limiter le volume de solution de lavage à verser dans chaque puits à 0,35 ml.
6. Ajouter ou administrer **150 µl** de **réactif B ELISA** (substrat TMB) dans chacun des puits. Frapper la microplaque comme à l'étape 4.

7. Après avoir recouvert la plaque ou les plaques afin d'éviter l'exposition à la lumière, la (ou les) placer les microplaques sur un **agitateur** ajusté aux réglages recommandés (voir la section IV) pendant **30 ± 5 minutes** à température ambiante (22 °C à 28 °C).
8. Ajouter ou administrer **100 µl** de solution bloquante dans chacun des puits. Frapper la microplaque comme à l'étape 4. Éviter soigneusement de déverser le mélange.
9. Lire l'absorbance de la solution dans les puits au bout de 10 minutes avec un lecteur de microplaques réglé à 450 nm par rapport à 250 µl d'eau distillée ou déminéralisée. Avant la lecture, s'assurer que les deux « puits blancs » mentionnés à l'étape sont remplis de 250 µl d'eau distillée ou déminéralisée. Lire la plaque une autre fois avec le lecteur réglé à 405 nm si on utilise de l'eau distillée ou déminéralisée.
Remarque : La deuxième lecture permet d'étendre la validité analytique de la courbe d'étalonnage jusqu'à la valeur représentée par l'étalon le plus élevé, qui est d'environ 450 mIU/ml. (La concentration exacte est indiquée sur l'étiquette de la fiole et sera légèrement différente d'un lot à l'autre). En conséquence, les échantillons de patients ayant une EPO > au pénultième étalon (le deuxième après le plus élevé) étalon, soit l'étalon E, peuvent être quantifiés et comparés à toutes les valeurs indiquées par la courbe d'étalonnage jusqu'à celle de la concentration la plus élevée, à l'aide d'une lecture à 405 nm, loin de la longueur d'onde de l'absorbance maximale. En général, il est conseillé de lire les échantillons de patients et de contrôles avec une longueur d'onde de 450 nm si les concentrations d'EPO ne dépassent pas celle de l'étalon E. Les autres concentrations doivent être interpolées avec une lecture à 405 nm.
10. A partir des valeurs finales d'absorbance obtenues dans l'étape précédente, tracer deux courbes d'étalonnage à partir d'une lecture à 405 nm et d'une lecture à 450 nm, utilisant une interpolation avec spline cubique, 4 PL ou point à point pour quantifier la concentration d'EPO.

REMARQUES SUR LES PROCÉDURES

- Les échantillons dont les valeurs sont inférieures à la limite de détection (1,1 mIU/ml) doivent être indiqués par la mention « < 1,1 mIU/ml ».
- Il est recommandé de doser tous les étalons, contrôles et échantillons de patients en double exemplaire, jusqu'à ce que le technicien ait acquis suffisamment d'expérience (démontrée par le coefficient de variation double inférieur à 10% [sauf dans le cas de valeurs inférieures à la deuxième plus basse norme (non-nulle)] et d'habileté à obtenir des résultats pour les contrôles de la trousse contenus dans les limites jugées acceptables.
- Il est conseillé d'éviter la formation de bulles lorsqu'on pipette les échantillons dans les puits.
- Les échantillons de patients dont les valeurs sont supérieures à celles de l'étalon le plus élevé (étalon F), environ 450 mIU/ml (voir la concentration exacte sur l'étiquette de la fiole, parce qu'elle varie d'un lot à l'autre), doivent être dilués avec l'étalon A (étalon zéro) et dosés à nouveau. Multiplier le résultat par le facteur de dilution. Ou bien, signaler le résultat comme étant supérieur à la concentration de l'étalon le plus élevé (étalon F). Par exemple, si une valeur EPO de 494 mIU/ml est affectée à l'étalon F, elle doit être indiquée par la mention « > 494 mIU/ml ».
- Ne pas mélanger les réactifs provenant de lots différents.
- De préférence, mélanger des volumes égaux de Réactif 1 (anticorps biotinylé) et de Réactif 2 (anticorps marqué à l'enzyme) et en quantités suffisantes pour le dosage dans un flacon propre de couleur ambre. Le réactif combiné reste stable pendant sept (7) jours s'il est conservé à 4°C. Verser ensuite 50 µl de l'anticorps mélangé dans chaque puits. Cette méthode remplace les étapes 3 et 4 de l'autre procédure et doit être suivie de l'incubation.
- Pendant le mélange, évitez toutes éclaboussures de réactifs hors des puits. Ceci risque d'altérer la précision.

IX. CALCUL DES RÉSULTATS

Méthode manuelle

1. Pour les lectures à 450 nm, tracer une courbe dose-réponse (courbe d'étalonnage) à partir des valeurs des cinq premiers étalons fournis, soit les étalons A, B, C, D et E. Pour les lectures à 405 nm, tracer une deuxième courbe dose-réponse avec les étalons A, D, E et F. Tracer une courbe dose-réponse (courbe d'étalonnage) à l'aide d'étalons A, B, C, D et E.
2. Attribuer la concentration indiquée sur la fiole en mIU/ml à chaque étalon. Reporter les données de la courbe d'étalonnage sur du papier millimétré où l'axe X représentera la concentration et l'axe Y l'unité d'absorbance correspondante.
3. Tracer une ligne droite entre 2 points adjacents. Cet algorithme mathématique est appelé couramment le calcul « point à point ». Obtenir la concentration de l'échantillon en repérant l'unité d'absorbance sur l'axe Y et la valeur de concentration correspondante sur l'axe X. En général, il est conseillé de lire les échantillons de patients et de contrôles avec une longueur d'onde de 450 nm si les concentrations d'EPO ne dépassent pas la concentration du pénultième étalon [le second après le plus élevé], soit l'étalon E. Les autres concentrations EPO au-dessus de cette valeur (dans l'exemple ci-après, 156 mIU/ml) doivent être interpolées avec la lecture à 405nm.

Méthode automatique :

4. Les programmes informatiques utilisant une courbe spline cubique ou 4 PL ou une

méthode point à point donnent généralement des résultats convenables. Pour les lectures à 450 nm, tracer une courbe dose-réponse (courbe d'étalonnage) à partir des valeurs des cinq premiers étalons fournis, soit les étalons A, B, C, D et E. Pour les lectures à 405 nm, tracer une deuxième courbe dose-réponse avec les étalons A, D, E et F. Tracer une courbe dose-réponse (courbe d'étalonnage) à l'aide d'étalons A, B, C, D et E.

Données d'échantillon à 450 nm [lecture de l'unité d'absorbance brute par rapport à l'eau distillée ou déminéralisée]

Puits à microplaques	1 ^{ère} lecture Unité d'absorbance	2 ^{ème} lecture Unité d'absorbance	Moyenne Unité d'absorbance	EPO mIU/ml
Étalon A	0,006	0,006	0,006	0
Étalon B	0,094	0,092	0,093	10,3
Étalon C	0,232	0,219	0,226	24,8
Étalon D	0,509	0,474	0,492	48
Étalon E	1,918	1,799	1,859	156
Contrôle 1	0,171	0,170	0,171	18,2
Contrôle 2	2,270	2,200	2,240	184
Échantillon du patient 1	0,012	----	0,012	1,1
Échantillon du patient 2	0,031	----	0,031	3,2
Échantillon du patient 3	0,089	----	0,089	9,6
Échantillon du patient 4	0,508	----	0,508	50,1
Échantillon du patient 5	3,283	----	3,283	>156*

* La concentration lue étant > à la concentration de l'étalon E, soit 156 mIU/ml, il est recommandé d'utiliser les données obtenues à 405 nm reportées dans le tableau ci-après, **Données d'échantillon à 405 nm**.

Données d'échantillon à 405 nm [lecture de l'unité d'absorbance brute par rapport à de l'eau distillée ou déminéralisée]

Puits de microplaque	1 ^{ère} lecture Unité d'absorbance	2 ^{ème} lecture Unité d'absorbance	Moyenne Unité d'absorbance	EPO mIU/ml
Étalon A	0,000	0,000	0,000	0
Étalon D	0,140	0,130	0,135	48
Étalon E	0,538	0,508	0,523	156
Étalon F	2,060	2,030	2,040	523
Contrôle 1	0,046	0,044	0,045	<156**
Contrôle 2	0,649	0,626	0,638	184
Échantillon du patient 1	0,000	----	0,000	<156**
Échantillon du patient 2	0,007	----	0,007	<156**
Échantillon du patient 3	0,023	----	0,023	<156**
Échantillon du patient 4	0,140	----	0,140	<156**
Échantillon du patient 5	1,161	----	1,161	302

Dans le cas des échantillons ayant une concentration < à la concentration de l'étalon E, soit 156 mIU/ml, il est recommandé d'utiliser les données obtenues à 450 nm reportées dans le tableau précédent, **Données d'échantillon à 450 nm. Cette procédure devrait donner les résultats avec la meilleure sensibilité du dosage. *Remarque : Les données présentées le sont à titre indicatif et ne doivent pas être utilisées à la place des données obtenues lors du dosage.*

X. CONTRÔLE QUALITÉ

Il convient d'analyser les échantillons sérum ou les groupes de sérum du contrôle à chaque fois qu'on effectue un test d'étalons et d'échantillons de patients. Utiliser des méthodes statistiques appropriées pour évaluer si les résultats de l'analyse d'échantillons de contrôle sont acceptables. La première fois que le laboratoire introduit ce dosage EPO, les résultats d'échantillons de patients ne doivent être issus que si les résultats du contrôle de la trousse sont dans les limites jugées acceptables. Si une ou plusieurs valeurs des échantillons du contrôle qualité se situent en dehors des limites acceptables, il est nécessaire de répéter le dosage. À partir du moment où le laboratoire génère ses propres données, les paramètres du contrôle qualité doivent se baser sur ces données statistiques via l'utilisation des contrôles de la trousse et/ou des groupes de sérum créés par le laboratoire. Utiliser les courbes de Levy-Jenning pour les résultats de contrôles. Si les résultats de tous les échantillons de contrôle se situent dans les limites des écarts-types géométriques + 2 de la moyenne, sans biais des données du contrôle qualité, le dosage doit être considéré acceptable. La règle de Westgard doit être respectée afin de se conformer aux réglementations CLIA 88. Si les résultats de contrôle ne correspondent pas aux paramètres indiqués, les résultats du dosage sont considérés comme non valables.

XI. LIMITES DE LA PROCÉDURE

Comme tout analyte utilisé en complément à un diagnostic, les résultats d'EPO doivent être interprétés avec soin en association avec les présentations cliniques globales et tout autre test diagnostique de support. Des protéines IgG purifiées de la même espèce que celle pour laquelle les anticorps capturés et conjugués ont été dérivés et un anticorps bloquant hétérophile commercial ont été incorporés aux réactifs pour réduire les

anticorps hétérophiles.¹⁴ L'élimination totale d'une interférence hétérophile n'est toutefois pas garantie. Il est donc recommandé de doser au moins trois solutions diluées des résultats élevés et/ou suspectés positifs afin de détecter le non-parallélisme aux normes de référence.¹⁵

Puisque les résultats obtenus avec un seul dosage EPO commercial peuvent être très différents de ceux obtenus avec un autre, il est recommandé d'adopter le même test EPO commercial pour toute série de tests effectués sur un même patient.¹⁶ Ce test peut ne pas être suffisamment sensible pour distinguer de façon régulière les valeurs EPO anormalement basses des valeurs normales.

On a constaté des valeurs EPO inférieures à celles attendues dans les cas d'anémies associées aux conditions suivantes : arthrite rhumatoïde, syndrome d'immunodéficience acquise, cancer et colite ulcérée¹⁷, drépanocytose et chez les nouveau-nés prématurés.¹⁸

Après une greffe de moelle osseuse allogénique, une réponse altérée de l'érythropoïétine peut retarder la récupération de l'érythropoïétine.¹⁷ Chez les patients ayant une hypergammaglobulinémie associée à un myélome multiple ou à la maladie de Waldenstrom, la production d'érythropoïétine est insuffisante par rapport à la concentration d'hémoglobine. Ceci a été lié à la viscosité accrue du plasma.¹⁷ Aucune recherche n'a été effectuée sur des médicaments interférant avec le dosage.

Les taux d'EPO des personnes qui vivent à des altitudes élevées et souffrent d'érythrocytose peuvent tomber rapidement en dessous de la normale dès qu'elles retournent à de basses altitudes.¹⁹

Les compléments contenant des niveaux de biotine élevés comme ceux commercialisés pour les bienfaits des cheveux, de la peau et des ongles, peuvent renfermer des quantités de biotine nocives. Des niveaux de biotine plus élevés que la dose journalière recommandée risquent de perturber l'analyse. Par conséquent, il est capital d'informer les professionnels de santé et les patients de l'absorption de biotine au moment de prélever les échantillons afin d'éviter toute erreur dans les résultats d'analyse.

XII. VALEURS ATTENDUES

Les taux d'EPO ont été mesurés chez 120 individus apparemment sains, aux États-Unis, avec le test EPO ELISA de Biomerica. Les échantillons comprennent 61 hommes et 59 femmes âgés entre 18 ans et 96 ans. Aucune différence statistique significative au niveau des valeurs de référence n'est apparue dans les données de la population masculine et féminine. Cette découverte de l'absence de différence entre les deux sexes correspond aux rapports existants²¹. Par ailleurs, les valeurs EPO ne semblent pas dépendre de l'âge, sauf en ce qui concerne les valeurs les plus élevées obtenues dans les échantillons de jeunes adultes, âgés environ de 22 à 42 ans. Avec la méthode non paramétrique pour l'analyse des valeurs de référence décrite dans la publication NCCLS « How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory » (NCCLS Document C28-A, Vol. 15 No. 4) **les références limites (2,5 – 97,5 centile) obtenues étaient de 3,22 – 31,9 mIU/ml** pour l'EPO sérique. Chaque laboratoire devrait établir ses propres valeurs de référence attendues.

« Chez les patients ayant une érythrocytose due à une hypoxie non compensée, l'EPO immunoréactive dans le sérum est élevée ; chez ceux dont l'hypoxie est compensée, le taux d'EPO immunoréactive dans le sérum se situe généralement dans les limites normales et chez les patients ayant un polycythemia vera, le taux d'EPO immunoréactive dans le sérum est normal ou bas. En conséquence, si un taux élevé d'EPO dans le sérum suggère que l'érythrocytose est un phénomène secondaire et un taux d'EPO faible étaye la possibilité d'une érythropoïèse autonome, un taux normal d'EPO dans le sérum n'exclut ni l'hypoxie ni la production autonome d'EPO comme étant la cause de l'érythrocytose. »²⁰

XIII. PERFORMANCES

Précision

Quatre-vingt cinq (85) échantillons de patients dont les valeurs d'EPO varient de 3,8 à 304 mIU/ml ont été testés selon la procédure ELISA de Biomerica et un dosage d'EPO ELISA. L'analyse de régression linéaire donne les statistiques suivantes :

$$\text{Biomerica ELISA} = \text{Dosage ELISA de } 0,94 - 0,41 \text{ mIU/ml} \\ r = 0,989 \quad N = 85$$

Sensibilité

La sensibilité, soit la limite minimale de détection, de ce dosage est définie comme étant la plus petite valeur distincte de zéro à la limite de confiance de 95 %. La sensibilité du test EPO ELISA de Biomerica est de 1,1 mIU/ml. Les résultats d'échantillons de patients inférieurs à 1,1 mIU/ml doivent donc être indiqués par la mention « Moins de 1,1 mIU/ml. »

Précision et reproductibilité

La précision intra-essai du test EPO ELISA de Biomerica a été calculée à partir de 22 dosages réitérés sur chacun des deux échantillons.

Variation intra-essai

Échantillon	Valeur moyenne	N	Coefficient
-------------	----------------	---	-------------

	(mIU/mL)		de variation %
A	14,4	22	8,4
B	189	22	4,8

La précision intra-essai du test EPO ELISA de Biomerica a été calculée à partir des données de 22 dosages différents effectués sur deux échantillons.

Variation inter-essais

Échantillon	Valeur moyenne (mIU/mL)	N	Coefficient de variation %
A	20,4	22	8,8
B	183	22	5,1

Spécificité et réactivité croisée

La réactivité croisée dans l'EPO a été étudiée en ajoutant diverses substances à l'étalon zéro (étalon A).

Réactif mixte	Quantité de réactif mixte ajoutée
Transferrine humaine	400 µg/ml
Bilirubine humaine (non conjuguée)	200 µg/ml
Hémoglobine humaine	5 mg/ml
Alpha-globuline humaine	60 mg/ml
Alpha2-Macroglobuline humaine	500 µg/ml
□ 1-Acide Glucoprotéine humaine,	800 µg/ml
□ 1-Antitrypsine humaine	500 µg/ml
Triglycérides	30 mg/ml
Albumine humaine	60 mg/ml
Globuline Gamma humaine	60 mg/ml
ACTH (molécule intacte : séquence d'acides aminés 1-39)	5000 pg/ml
TSH	100 µIU/ml

Aucun des réactifs mixtes n'interfère avec ce test EPO ELISA dans les concentrations étudiées. Les très faibles altérations d'EPO constatées avec certains substrats mixtes se situaient largement dans les limites statistiques d'une variation intra-essai.

Récupération

On a ajouté des volumes différents d'EPO à quatre sérums de patients différents pour déterminer la récupération. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Échantillon de sérum	EPO endogène (mIU/mL)	EPO ajoutée (mIU/mL)	Valeur attendue (mIU/mL)	Valeur mesurée (mIU/mL)	Récupération (%)
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%

Linéarité des dilutions d'échantillons de patients : Parallélisme

Trois échantillons de sérum de patients ont été dilués avec l'étalon A (étalon zéro). Les résultats en mIU/ml sont indiqués ci-après :

Échantillon	Dilution	Valeur attendue	Valeur observée	% Observée ÷ attendue
A	Non dilué	-	247,0	-
	1:2	123,5	119,0	96%
	1:4	61,8	58,5	95%
	1:8	30,9	28,8	93%
B	Non dilué	-	139,0	-
	1:2	69,5	74,0	106%
	1:4	34,8	39,9	114%
	1:8	17,4	19,8	114%
C	Non dilué	-	>500,0	-
	1:2	-	253,0	-
	1:4	126,5	116,0	92%
	1:8	63,3	57,0	90%

Effet crochet

La trousse EPO ELISA de Biomerica n'a montré aucun « effet crochet » dans les diluants standard enrichis avec 200 000 mIU/ml d'EPO. En outre, trois échantillons ayant des valeurs élevées connues d'EPO (1920 mIU/ml, 1520 mIU/ml et 966 mIU/ml) ont été testés sans diluant et leurs résultats étaient beaucoup plus élevés que la norme maximale. Toutefois, il est conseillé de diluer les échantillons dont les taux d'EPO sont supérieurs à l'étalon le plus élevé et de les doser à nouveau pour obtenir des valeurs correctes.

XIV. RÉFÉRENCES :

- 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., Cronkites, 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. SYMBOLES

	Température de conservation
	Code de fournée
	Expiration
	Fabricant
	Agent agréé
	Précaution, voir des instructions
	Pour un diagnostic in vitro
	N° de catalogue

XVI. COMMANDE DE PRODUITS

COMMANDES :



Envoyer les commandes à :
 BIOMERICA, INC.
 17571 Von Karman Avenue
 Irvine, CA 92614 U.S.A.
 Téléphone : (949) 645-2111
 (949) 553-1231
 www.biomerica.com
 bmra@biomerica.com

2°C / 8°C



Téléphone :

Site Web :

E-mail :

67025-14_fre.doc



selon IVDD 98/79/ CE
 MDSS GmbH
 Schiffgraben 41
 D-30175 Hannover
 Allemagne

mai 2018

