

Test EPO [eritropoietina] ELISA [saggio immunoenzimatico]

REF 7025

Analisi quantitativa specifica per la determinazione
dell'eritropoietina nel siero
maggio 2018



I. USO PREVISTO

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

II. RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

L'eritropoietina (EPO) è una glicoproteina con peso molecolare pari a 30.000 ~ 34.000 Dalton. L'EPO umana è un polipeptide formato da 165 aminoacidi, contenente una catena di carboidrati con legami O-glicosidici e tre catene con legami N-glicosidici¹. L'EPO ricombinante è un buon sostituto della proteina naturale da utilizzare in un saggio immunoenzimatico². I livelli di EPO nel siero dipendono dalla velocità di produzione e di depurazione della proteina. Il 90% dell'EPO è prodotto nelle cellule peritubulari del rene nell'adulto, in risposta a una diminuzione dell'ossigenazione tissutale^{3,4}. Vi sono indicazioni che la proteina su queste cellule che rileva la saturazione di ossigeno nel sangue sia una proteina contenente un gruppo eme⁵. Ad una riduzione della pO₂ del plasma, una funzione dell'ematocrito, corrisponde un aumento della concentrazione di EPO⁶. Alcune osservazioni suggeriscono che normalmente si ha una correlazione inversa tra i livelli di EPO nel siero e la massa eritrocitaria⁷.

La quantificazione della concentrazione di eritropoietina nel siero serve come elemento diagnostico aggiuntivo per determinare la causa di anemia o eritrocitosi. Tutte le forme di anemia aplastica, emolitica e da carenza di ferro si traducono in un aumento dell'EPO nel siero. Invece, nei pazienti con anemia secondaria dovuta a insufficienza renale e con altre patologie come la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), i livelli EPO in genere sono eccessivamente bassi alla luce del grado di anemia. Con ogni probabilità ciò è dovuto all'incapacità del rene malato di produrre quantità adeguate di EPO⁸. Basse concentrazioni di EPO costituiscono un segnale di avvertimento precoce del rigetto nel trapianto renale¹⁰. L'EPO inoltre può venire impiegata per monitorare i pazienti affetti da AIDS sottoposti a terapia con zidovudina (AZT). Una maggiore concentrazione di EPO verifica che l'anemia associata con il trattamento a base di AZT sia dovuta a ipoplasia o aplasia eritrocitaria¹⁰.

La policitemia vera, o eritrocitosi primaria (aumento della massa eritrocitaria) nasce da una iperproduzione non stimolata di eritrociti. Di conseguenza, l'aumento di emoglobina causa una produzione ridotta di EPO, che a sua volta determina livelli subnormali di EPO nel siero⁹. Le policitemie secondarie, anch'esse caratterizzate da un aumento della massa eritrocitaria totale, insorgono come risposta fisiologica a livelli elevati di EPO nel sangue dovuti a ipossia tissutale. L'ipossia può essere ricondotta a fattori quali fibrosi polmonare, disturbi cardiovascolari, esposizione prolungata ad altitudini elevate, forme anomale di emoglobina o trattamento farmacologico¹⁰. Nel caso dei tumori che producono EPO, l'EPO può essere impiegata come marker tumorale per monitorare l'efficacia della terapia.

III. PRINCIPIO DEL TEST

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

Pozzetto rivestito di streptavidina - Anti-EPO biotinilato (monoclonale di topo) - EPO

In questo saggio, i calibratori, i controlli o i campioni paziente vengono incubati contemporaneamente con un anticorpo marcato con enzima e con uno coniugato con biotina in un pozzetto per micropiastre rivestite di streptavidina. Al termine dell'incubazione del saggio, il micropozzetto viene lavato per eliminare i residui non legati e l'enzima legato alla fase solida viene incubato con il substrato

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

IV. COMPONENTI DEL KIT

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

MATERIALI E STRUMENTAZIONE (NON IN DOTAZIONE)

- Lettore per micropiastre in grado di leggere a 450 nm e 405 nm.
- Lavatore per micropiastre (il lavaggio manuale è consentito in assenza di un lavatore automatico).
- Pipette di precisione per 25, 200, 100 e 150 µL.
- Opzionale: distributore multicanale o a ripetizione per 25, 100 e 150 µL.
- Timer con accuratezza pari a ± 2 minuti.
- Acqua distillata o deionizzata.
- Agitatori per micropiastre: Biomerica ha rilevato che, con gli agitatori di diametro sotto indicato, i kit di streptavidina manterranno una risposta ottimale alle seguenti impostazioni di velocità:

Agitatori per micropiastre	Diametro di agitazione	Impostazione di velocità
Orbitale	3 mm (0,118 in)	600 ± 10 giri/minuto
	19 mm (0,75 in)	170 ± 10 giri/minuto
Lineare	25 mm (0,98 in)	170 ± 10 giri/minuto

V. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Test destinato all'impiego diagnostico *in vitro*.

Benché i reagenti forniti nel presente kit siano stati studiati in modo da non contenere componenti ematiche umane, i campioni di pazienti che potrebbero risultare positivi agli anticorpi HBsAg, HBeAg o HIV devono essere trattati come materiale biologico potenzialmente infettivo. Osservare le precauzioni standard nella manipolazione dei campioni, analogamente a quanto previsto per i campioni di pazienti non analizzati.

La soluzione bloccante è un composto di 1 N acido solforico, un forte acido che, anche se diluito, va trattato con grande cautela, poiché può provocare ustioni. Indossare un paio di guanti, occhiali e indumenti protettivi. Lavare immediatamente eventuali versamenti con abbondanti quantità di acqua. Non respirare i vapori ed evitare di inalarli.

Il Reagente 1 ELISA, un anticorpo EPO biotinilato, contiene ProClin 300 come

conservante. Evitare il contatto e indossare guanti protettivi quando si manipola questo reagente. In caso di contatto accidentale con la pelle, lavare immediatamente con acqua e sapone. In caso di contatto con gli occhi, lavare con acqua per 15 minuti. In caso di ingestione, evitare di vomitare e bere grosse quantità di acqua. Rivolgersi tempestivamente a un medico.

Il reagente A ELISA, la soluzione di lavaggio concentrata, i calibratori ed i controlli EPO contengono ciprofloxacina cloridrato come conservante. Non avvicinarsi al personale che manifesta sensibilità ai farmaci a base di chinolina. Le donne in stato di gravidanza devono evitare il contatto con la ciprofloxacina.

Se un reagente appare torbido, non eseguire il test e contattare il fornitore.

Sono disponibili in commercio vari tipi di agitatori con specifiche diverse. Qualora l'agitatore per micropiastre non rientri nell'intervallo sopra specificato, il laboratorio dovrà definire il proprio intervallo ottimale.

VI. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

La determinazione di EPO deve essere effettuata sul siero umano. Per analizzare il campione in duplicato, sono necessari 400 µL di siero umano. Si raccomanda di raccogliere il campione tra le ore 7:30 e le 12:00 del mattino, a causa della variazione diurna dell'eritropoietina (riportata in letteratura^{11,12}). Raccogliere il sangue intero senza anticoagulante e, se possibile, lasciare coagulare il sangue a 2 ~ 8°C. È stato evidenziato che i campioni sierici coagulati a temperatura ambiente (22 ~ 28°C) causano una diminuzione del valore EPO, come valutato dal test radioimmunologico, pari a circa il 30% rispetto alla coagulazione mediante congelamento¹³. Separare quindi tempestivamente il siero, preferibilmente in una centrifuga refrigerata, e conservare a una temperatura pari o inferiore a -15°C. I campioni di siero devono essere conservati a 2 ~ 8°C per un massimo di 24 ore. I campioni congelati a -15°C rimangono stabili per un massimo di 12 mesi. Non conservare i campioni in congelatori con scongelamento automatico. Evitare di sottoporre i campioni a cicli ripetuti di congelamento e scongelamento. Per la conservazione a lungo termine dei campioni, prima del congelamento si raccomanda di distribuire i campioni in provette. Prima dell'uso, portare tutti i campioni a temperatura ambiente (22 ~ 28°C) e mescolare agitando delicatamente per inversione. Evitare campioni fortemente emolizzati o lipemici.

VII. PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE

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

1. Tutti i reagenti, tranne i calibratori, i controlli e la soluzione di lavaggio concentrata, sono pronti per l'uso. Conservare tutti i reagenti a 2 ~ 8°C.
2. Ricostituire la provetta del calibratore zero (calibratore A) con 4 mL di acqua distillata o deionizzata e mescolare. Per tutti i calibratori non zero (calibratore B ~ F) e i controlli 1 e 2, ricostituire ciascuna provetta con 2 mL di acqua distillata o deionizzata e mescolare. Incubare le provette per 10 minuti, quindi mescolare abbondantemente agitando delicatamente per inversione per completare la ricostituzione. **Dopo la ricostituzione, usare calibratori e controlli quanto prima. Dopo l'uso, congelare (-15°C) al più presto i calibratori ed i controlli rimanenti.** Gli standard e i controlli sono stabili a -15°C per 6 settimane dopo la ricostituzione, con un massimo di 3 cicli di congelamento-scongelamento, se trattati in base alle raccomandazioni riportate nella sezione "Note sulla procedura".
3. **Reagente A ELISA:** Soluzione di lavaggio concentrata: mescolare abbondantemente il contenuto della soluzione di lavaggio concentrata. In presenza di un precipitato nella soluzione di lavaggio concentrata, dovuto a conservazione a temperature inferiori (es. 4°C), dissolvere ponendo la provetta in un bagno ad acqua o in un forno a 37°C con agitatore. Aggiungere la soluzione di lavaggio concentrata (30 mL) a 570 mL di acqua distillata o deionizzata e mescolare. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 90 giorni se conservata a temperatura ambiente.

VIII. PROCEDURA DI ANALISI

1. Distribuire nel contenitore un numero sufficiente di **strisce rivestite di streptavidina** per eseguire tutti e sei (6) i calibratori EPO, A-F tra i CALIBRATORI di EPO (la concentrazione esatta è indicata sull'etichetta della provetta), sieri di controllo qualità e campioni paziente. Come minimo, lasciare liberi due pozzetti come "bianchi". Fare riferimento al passo 9 per la lettura finale della micropiastre.
2. Pipettare **200 µL** di calibratori, controlli e campioni nel pozzetto previsto. **Dopo l'uso, congelare (-15°C) al più presto i calibratori ed i controlli rimanenti.**
3. Aggiungere o versare **25 µL** di reagente 1 (anticorpo biotinilato) in ciascun pozzetto contenente i calibratori, controlli e campioni.
4. Aggiungere o versare **25 µL** di reagente 2 (anticorpo marcato con enzima) nei medesimi pozzetti. Battere la micropiastre con decisione contro un oggetto rigido, una penna per esempio, per ottenere una mescolatura accurata del campione con i reagenti. Per ottenere la mescolatura ottimale, ripetere questa operazione per almeno 5 volte su ciascuno dei tre lati rimanenti della piastra. Fare attenzione a non rovesciare il liquido. Coprire le micropiastre con una pellicola di alluminio o con una vaschetta per ripararle dalla luce. Posizionarle su un **agitatore** alle impostazioni consigliate (vedere la sezione **IV**) per **2 ore ± 15 minuti** a

temperatura ambiente (22 ~ 28°C).

5. Aspirare completamente il liquido, quindi lavare/aspirare ogni pozzetto cinque (5) volte con la soluzione di lavaggio (preparata dal reagente A), mediante un lavatore automatico per micropiastre. Impostare il volume della soluzione di lavaggio in modo che in ciascun pozzetto vengano versati 0,35 mL.
6. Aggiungere o versare **150 µL** di **reagente B ELISA** (substrato TMB) in ogni pozzetto. Picchiettare la micropiastre come descritto nel passaggio 4.
7. Coprire le micropiastre per ripararle dalla luce e posizionarle su un **agitatore** alle impostazioni consigliate (vedere la sezione **IV**) per **30 ± 5 minuti** a temperatura ambiente (22 ~ 28°C).
8. Aggiungere o versare **100 µL** di soluzione bloccante in ogni pozzetto. Picchiettare la micropiastre come descritto nel passaggio 4. Fare attenzione a non rovesciare il liquido.
9. Leggere l'assorbanza della soluzione nei pozzetti entro 10 minuti, usando un lettore per micropiastre impostato su **450 nm**. Prima di leggere, accertarsi che entrambi i "pozzetti del bianco", come indicato al punto 1, siano riempiti con 250 µL di acqua distillata o deionizzata. Leggere la piastra con il lettore impostato a **405 nm** contro acqua distillata o deionizzata.
Nota: la seconda lettura serve ad ampliare la validità analitica della curva di calibrazione al valore rappresentato dal calibratore con il livello massimo, pari a circa 450 mIU/mL (l'esatta concentrazione è riportata sull'etichetta della provetta e può variare leggermente da una partita all'altra). Pertanto i campioni di pazienti con un livello EPO > del penultimo calibratore (precedente quello più elevato), ossia il calibratore E, possono essere quantificati in relazione a una curva di calibrazione, costituita dai valori compresi sino all'equivalente di concentrazione del calibratore più elevato, usando il valore 405 nm, lontano dalla lunghezza d'onda della massima assorbanza. I campioni paziente e di controllo devono essere letti usando il valore 450 nm per concentrazioni di EPO sino alla concentrazione del calibratore E. Concentrazioni di EPO superiori a quella del calibratore E devono essere interpolate con il valore 405 nm.
10. Utilizzando i valori di assorbanza finali ottenuti nella fase precedente, costruire due curve di calibrazione, usando i valori 405 nm e 450 nm mediante interpolazione con spline cubica, a 4 parametri logistici o punto-punto per quantificare la concentrazione di EPO.

NOTE SULLA PROCEDURA

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

IX. CALCOLO DEI RISULTATI

Metodo manuale

1. Per i valori pari a 450 nm, costruire una curva di risposta alla dose (curva di calibrazione) usando i primi cinque calibratori forniti (calibratori A, B, C, D, E). Per i valori pari a 405 nm, costruire una seconda curva di risposta alla dose, usando i calibratori A, D, E, F.

Costruire una curva di risposta alla dose (curva di calibrazione) usando Calibratori A, B, C, D e E.

2. Assegnare la concentrazione per ogni calibratore indicata sulla provetta in mIU/mL. Su carta a scala lineare, tracciare i dati dalla curva di calibrazione con la concentrazione sull'asse delle ascisse e il corrispondente valore di assorbanza sull'asse delle ordinate.
3. Tracciare una linea retta tra 2 punti adiacenti. Questo algoritmo matematico è noto come calcolo "punto-punto". Ottenere la concentrazione del campione individuando l'unità di assorbanza sull'asse delle ordinate e il corrispondente

valore di concentrazione sull'asse delle ascisse. I campioni paziente e di controllo devono essere letti sulla base del valore 450 nm per concentrazioni di EPO sino al penultimo calibratore, ossia il calibratore E. Concentrazioni di EPO superiori a quella del penultimo calibratore (nell'esempio seguente inferiore a 156 mIU/mL) devono essere interpolate con il valore 405 nm.

Metodo automatico

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

Costruire una curva di risposta alla dose (curva di calibrazione) usando Calibratori A, B, C, D e E.

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

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

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

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

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

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

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

X. CONTROLLO QUALITÀ

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

XI. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Analogamente a qualsiasi analita impiegato come elemento diagnostico aggiuntivo, i risultati dell'EPO vanno interpretati con attenzione, all'interno del quadro clinico complessivo e alla luce di altri test diagnostici correlati.

Le proteine IgG purificate, della stessa specie di quelle per le quali sono stati derivati

gli anticorpi di cattura e di rilevazione, oltre a un anticorpo bloccante eterofilo commerciale, sono state incorporate nei reagenti per ridurre al minimo gli anticorpi eterofili¹⁴. Tuttavia, non può essere garantito che l'interferenza eterofila sia stata completamente eliminata. Si raccomanda pertanto di analizzare almeno tre diluizioni dei risultati elevati e/o sospetti positivi, in modo tale da rilevare un non parallelismo rispetto agli standard di riferimento¹⁵.

Poiché i risultati ottenuti con un test EPO commerciale possono differire significativamente da quelli ottenuti con altri tipi, si raccomanda di eseguire analisi seriali sullo stesso paziente nel corso del tempo con lo stesso test EPO commerciale¹⁶. Questo test potrebbe non essere sufficientemente sensibile per discriminare in modo coerente i valori EPO eccessivamente bassi dai livelli normali. Livelli EPO più bassi del previsto sono stati rilevati in presenza di anemie associate alle seguenti condizioni: artrite reumatoide, sindrome da immunodeficienza acquisita, cancro, colite ulcerosa¹⁷, anemia falciforme e nei neonati prematuri¹⁸. Dopo trapianto di midollo osseo allogenico, un'alterata risposta all'eritropoietina può ritardare il recupero¹⁷.

I pazienti affetti da ipergammaglobulinemia associata a mieloma multiplo o macroglobulinemia di Waldenström manifestano una ridotta produzione di eritropoietina in rapporto alla concentrazione di emoglobina. Si tratta di un fenomeno legato a un incremento della viscosità del plasma¹⁷. Non sono stati esaminati farmaci per determinare l'interferenza dell'analisi.

I livelli di EPO in soggetti residenti ad altitudini elevate e affetti da eritrocitosi possono abbassarsi rapidamente ai livelli normali a basse altitudini¹⁹.

I supplementi contenenti alti livelli di biotina, come quelli commercializzati per i capelli, la pelle e le unghie, possono contenere una quantità di biotina interferente. Livelli di biotina superiori alla dose giornaliera raccomandata possono interferire con il test ed è pertanto importante discutere con gli operatori sanitari ed i pazienti dell'assunzione di biotina durante la raccolta dei campioni per evitare errori nei risultati.

XII. VALORI PREVISTI

I livelli di EPO sono stati misurati mediante il test EPO ELISA in 120 individui in condizioni apparentemente normali negli Stati Uniti. La popolazione di pazienti è formata da 61 uomini e 59 donne, di età compresa fra 18 e 96 anni. Non è stata rilevata una differenza statistica significativa sui valori di riferimento ottenuti dalla popolazione femminile e maschile di dati. Il fatto che non vi sia una differenza tra i sessi è confermato dalla letteratura²¹. Inoltre, i valori EPO non mostrano legami significativi con l'età, ad eccezione di valori più elevati ottenuti in campioni prelevati nella fascia dell'età adulta compresa tra i 22 e i 42 anni. In base al metodo non parametrico per l'analisi dei valori di riferimento, definiti nella pubblicazione NCCLS "How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory" (documento NCCLS C28-A, Vol. 15 N. 4) i valori di riferimento (2,5 – 97,5 percentile) erano compresi tra **3,22 e 31,9 mIU/mL** per l'EPO nel siero. Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire il proprio intervallo di valori normali previsti.

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

XIII. CARATTERISTICHE DELLA PROCEDURA

Accuratezza

Ottantacinque (85) campioni di pazienti, con valori di EPO compresi tra 3,8 e 304 mIU/mL, sono stati analizzati mediante la procedura ELISA e un kit EPO ELISA. L'analisi di regressione lineare fornisce i seguenti dati statistici:

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

Sensibilità

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

Precisione e riproducibilità

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

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

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

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

Specificità e reattività incrociata

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

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

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

Recupero

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

Campione sierico	Endogeno EPO (mIU/mL)	EPO aggiunto (mIU/mL)	Valore previsto (mIU/mL)	Valore misurato (mIU/mL)	Recupero (%)
A	7,9	--	--	--	--
	7,1	50,0	57,1	52,8	92,5%
	5,5	150,0	155,5	150,0	96,5%
B	6,0	--	--	--	--
	5,4	50,0	55,4	57,2	103,2%
	4,2	150,0	154,2	168,0	108,9%
C	53,6	--	--	--	--
	48,2	50,0	98,2	105,0	106,9%
	37,5	150,0	187,5	202,0	107,7%
D	0	--	--	--	--
	0	50,0	50,0	50,2	100%
	0	150,0	150,0	145,0	96,7%

Linearità delle diluizioni del campione paziente: parallelismo

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

Campione	Diluizione	Previsto	Osservato	% osservato ÷ previsto
A	Non diluito	-	247,0	-
	1:2	123,5	119,0	96%
	1:4	61,8	58,5	95%
	1:8	30,9	28,8	93%
B	Non diluito	-	139,0	-
	1:2	69,5	74,0	106%
	1:4	34,8	39,9	114%
	1:8	17,4	19,8	114%
C	Non diluito	-	>500,0	-
	1:2	-	253,0	-
	1:4	126,5	116,0	92%
	1:8	63,3	57,0	90%

Effetto gancio ad alte dosi

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









XIV. BIBLIOGRAFIA

- 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., Cronkitts, 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. SIMBOLI

	Temperatura di conservazione
	Codice di lotto
	Scadenza
	Fabbricante
	Rappresentante autorizzato
	Attenzione, vedere le istruzioni
	All'impiego diagnostico in vitro
	n.° de Catálogo

XVI. INFORMAZIONI PER L'ORDINAZIONE

ORDINAZIONE Inviare un ordine d'acquisto al seguente indirizzo:

 BIOMERICA, INC.
17571 Von Karman Avenue
Irvine, CA 92614
U.S.A.

2°C / 8°C


Telefono: +1 949 645 2111
Fax: +1 949 553 1231
URL: www.biomerica.com
E-mail: bmra@biomerica.com





67025-14_ita.doc

maggio 2018



secondo IVDD 98/79/CE

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover
Germania