

Enzimoimmunoanálisis [ELISA] de eritropoyetina

REF 7025

Análisis cuantitativo específico para la determinación de eritropoyetina en suero

mayo 2018



I. USO PREVISTO

El inmunoanálisis para la detección de EPO de Biomerica se utiliza para la determinación cuantitativa de Eritropoyetina (EPO) en el suero humano. Este análisis está destinado a uso diagnóstico *in vitro*, como complemento para el diagnóstico de anemias y policitemias. Con el advenimiento de la administración de eritropoyetina recombinada como terapia biológica para aumentar la masa de eritrocitos, puede utilizarse un análisis de eritropoyetina para facilitar la predicción y el monitoreo de la respuesta al tratamiento con eritropoyetina recombinada en personas con anemia.

II. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La eritropoyetina (EPO) es una proteína altamente glucosilada con un peso molecular de 30.000 – 34.000 daltones aproximadamente. La EPO humana es un polipéptido que consta de 165 aminoácidos y contiene una cadena de carbohidratos enlazada por O y tres enlazadas por N¹. La EPO recombinada es un buen sustituto de la proteína nativa para su utilización en inmunoanálisis². Los niveles de EPO en suero dependen de la tasa de producción y la tasa de depuramiento de la proteína. El noventa por ciento de la EPO se produce en las células peritubulares del riñón adulto, en respuesta a una disminución de la oxigenación de los tejidos^{3,4}. La evidencia indica que la proteína de estas células que detecta la saturación de oxígeno de la sangre es una fracción que contiene hemoglobina⁵. A medida que el pO₂ del plasma (una función del hematocrito) disminuye, la concentración de EPO aumenta⁶. También hay observaciones que sugieren la presencia habitual de una correlación inversa entre los niveles de EPO en suero y la masa de eritrocitos⁷.

La cuantificación de la concentración de eritropoyetina en el suero sirve como un complemento diagnóstico para determinar la causa de la anemia o la eritrocitosis. La anemia aplásica, la anemia hemolítica y la anemia ferropénica producen una elevación de la EPO en el suero. Por lo general, los niveles de EPO en pacientes con anemia secundaria producida por insuficiencia renal y otros trastornos como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) son inadecuadamente bajos para el grado de anemia. Esto se origina principalmente por una disminución de la capacidad del riñón enfermo para producir cantidades adecuadas de EPO⁸. Las bajas concentraciones de EPO pueden constituir una advertencia temprana de rechazo de un trasplante de riñón¹⁰. La EPO también puede utilizarse para monitorear pacientes con SIDA que estén realizando una terapia con Zidovudina (AZT). Un aumento en la concentración de EPO verifica que la anemia asociada con una terapia con Zidovudina (AZT) se debe a hipoplasia de eritrocitos o aplasia¹⁰.

La policitemia rubra vera o eritrocitosis primaria (un aumento de la masa de eritrocitos) se origina debido a una hiperproducción no estimulada de eritrocitos. Por lo tanto, el aumento en la hemoglobina provoca una disminución en la producción de EPO, lo que a su vez origina niveles anormales de EPO en el suero⁹. Las policitemias secundarias, que también se caracterizan por un aumento en la masa total de eritrocitos, se producen como una respuesta fisiológica a niveles elevados de EPO circulatoria provocados por hipoxia de los tejidos. La hipoxia puede producirse por factores tales como fibrosis pulmonar, trastornos cardiovasculares, exposición prolongada a gran altitud, formas anormales de hemoglobina o tratamientos con drogas¹⁰. Algunos tumores producen EPO y, en estos casos, la EPO puede utilizarse como indicador del tumor para monitorear la efectividad del tratamiento.

III. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El inmunoanálisis para la detección de eritropoyetina de Biomerica es inmunoanálisis [ELISA] de dos sitios para la medición de la cadena ácida biológicamente activa de 165 aminoácidos. Utiliza dos anticuerpos monoclonales de ratón diferentes a la EPO humana, específicos para regiones bien definidas en la molécula de EPO. Uno de ellos está biotinilado y el otro está marcado con peroxidasa de rábano [HRP] para detección.

Pocillo de estreptavidina - AntiEPO biotinilada (monoclonal de ratón) -- EPO --
AntiEPO conjugada con HRP (monoclonal de ratón)

En este análisis, los calibradores, los controles y las muestras de los pacientes se incuban simultáneamente con el anticuerpo marcado con enzimas y un anticuerpo acoplado con biotina en un pocillo de microplaca recubierto con estreptavidina. Al final de la incubación del análisis, el micropocillo se lava para eliminar componentes sueltos y la enzima enlazada a la fase sólida se incuba con el sustrato, tetrametilbencidina (TMB).

Se agrega luego una solución de parada ácida para interrumpir la reacción, cambiándose el color a amarillo. La intensidad del color amarillo es directamente proporcional a la concentración de EPO en la muestra. Se genera una curva dosis-respuesta de la unidad de absorbancia frente a la concentración mediante la utilización de los resultados obtenidos de los calibradores. Las concentraciones de EPO presentes en los controles y las muestras de pacientes se determinan directamente a partir de esta curva. Los estándares de Biomerica, Inc. se han ajustado al estándar internacional de eritropoyetina de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cual consiste en EPO derivada de ADN recombinado. El estándar de referencia de la OMS que se utilizó fue el 1° estándar internacional de eritropoyetina (87/684).

IV. COMPONENTES DEL KIT

Componentes del kit	Descripción	Cantidad
RGT 1 = Reactivo 1	Anticuerpo de EPO biotinilado [EPO antihumana monoclonal de ratón] que contiene ProClin 300 como conservante	1 x 3,5 mL
RGT 2 = Reactivo 2	Anticuerpo de EPO marcado con peroxidasa (enzima) [EPO antihumana monoclonal de ratón]	1 x 3,5 mL
RGT A = Reactivo A	Concentrado de lavado de ELISA [salino con agente tensioactivo y con el conservante hidrocloreuro de ciprofloxacino]	1 x 30 mL
RGT B = Reactivo B	Sustrato TMB [tetrametilbencidina]	1 x 20 mL
SOLN = Solución de parada	Solución de parada para ELISA [ácido sulfúrico 1 N]	1 x 20 mL
PLA = Microplaca	Un soporte con tiras recubiertas de estreptavidina.	12 tiras de 8 pocillos
CAL = Calibradores A: 0 mIU/mL B: Consulte las etiquetas C: del vial para obtener D: las concentraciones E: exactas F:	Hormona EPO sintética liofilizada. El Calibrador cero liofilizado es una solución proteica con búfer y los demás calibradores se componen de hormona EPO sintética (1-165) en solución proteica con búfer. Estos estándares se han ajustado al 1° estándar internacional de eritropoyetina de la Organización Mundial de la Salud [EPO derivada de ADN recombinado] (87/684). Cada calibrador contiene el conservante hidrocloreuro de ciprofloxacino	1 x 4 mL para el calibrador cero 1 x 2 mL para todos los demás calibradores
CTRL = Controles 1 y 2 Consulte las etiquetas del vial para obtener los intervalos exactos	Liofilizados, 2 niveles. Hormona EPO sintética (1-165) en solución proteica con búfer. Cada control contiene el conservante hidrocloreuro de ciprofloxacino	1 x 2 mL por nivel

MATERIAL Y EQUIPO REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

- Lector de microplacas capaz de leer a 450 nm y 405 nm.
- Lavadora de microplacas [si no se puede disponer de una lavadora, se acepta el lavado manual].
- Pipetas de precisión para dosificar 25, 100, 200 y 150 µL.
- (Opcional): Un dosificador de canales múltiples o un dosificador de repetición para 25, 100 y 150 µL.
- Temporizador capaz de obtener una precisión de ± 2 minutos.
- Agua destilada o desionizada.
- Agitadores de microplaca: Biomerica ha descubierto que para los diámetros de agitador indicados a continuación, los kits de estreptavidina mantendrán una respuesta de rendimiento óptima en las siguientes configuraciones de velocidad:

Agitadores de microplaca	Diámetro de agitado	Configuración de velocidad:
Orbitario	3 mm (0.118 in)	600 ± 10 rpm
	19 mm (0.75 in)	170 ± 10 rpm
Lineal	25 mm (0.98 in)	170 ± 10 rpm

V. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Si bien el diseño específico de los reactivos suministrados en este kit garantiza la ausencia de componentes de la sangre humana, las muestras de pacientes, que pueden presentar anticuerpos de HBsAg, HBcAg o VIH, deben considerarse un riesgo biológico potencial. Deben tomarse las precauciones habituales en la manipulación de dichas muestras, como se hace con las muestras de pacientes no analizadas.

La solución de parada consiste en ácido sulfúrico 1 N. Se trata de un ácido potente. Si bien el mismo se encuentra diluido, debe manipularse con cuidado. Puede producir quemaduras y debe manipularse con guantes, gafas y ropa protectora adecuada. Cualquier derrame debe enjuagarse inmediatamente con abundante cantidad de agua. No respire cuando advierta el vapor del mismo y evite su inhalación.

El reactivo 1 de ELISA, el anticuerpo de EPO biotinilado, contiene ProClin 300 como conservante. Evite el contacto y utilice guantes al manipular este reactivo. En caso de producirse el contacto accidental con la piel, lávela inmediatamente con jabón suave y agua. En caso de que el reactivo entre en contacto con los ojos, lávelos con abundante agua por 15 minutos. En caso de ingestión, evite el vómito y suministre abundante cantidad de agua. Consulte inmediatamente con un médico.

El Reactivo A de ELISA, el concentrado de lavado y los calibradores y controles de EPO contienen hidrocloreuro de ciprofloxacino como conservante. Mantenga estos

productos alejados del personal que haya demostrado sensibilidad a drogas basadas en Quinoleína. Las mujeres que estén embarazadas o crean estarlo deben evitar todo contacto con el Ciprofloxacino.

Si se observa turbidez en algún reactivo, no realice el ensayo y póngase en contacto con su distribuidor.

Se encuentran a la venta diversos tipos de agitador con diferentes especificaciones. En caso de que el agitador de microplaca no se encuentre dentro del intervalo especificado anteriormente, se anima a cada laboratorio a establecer su propio intervalo óptimo.

VI. RECOPIACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

La determinación de la EPO debe realizarse en suero humano. Para realizar un análisis de la muestra por duplicado, se requiere 400 µL de suero humano. Se recomienda especialmente que la muestra se recolecte entre las 7:30 a.m. y las 12:00 del mediodía, ya que se ha informado sobre la variación diurna de la eritropoyetina en diferentes estudios.^{11,12} Recolecte sangre completa sin anticoagulante y permita, si fuera posible, que la misma se coagule entre 2-8°C. Se ha informado que las muestras de suero coaguladas a temperatura ambiente (22°C a 28°C) provocaron una disminución en el valor de la EPO, la cual fue evaluada a través de un radioinmunoanálisis de aproximadamente un 30% de la coagulación sobre hielo.¹³ Luego, el suero debe separarse inmediatamente, preferentemente en una centrifugadora refrigerada, y almacenarse a -15°C o menos. Las muestras de suero pueden almacenarse hasta 24 horas a 2-8°C. Las muestras de suero congeladas a -15°C son estables por un máximo de 12 meses. No almacene muestras en congeladores con descongelamiento automático. Evite el congelamiento y descongelamiento repetido de las muestras. Para el almacenamiento de muestras a largo plazo, se recomienda la colocación de las mismas en tubos para muestras o viales antes de proceder a su congelamiento. Antes de utilizarlas, deje que las muestras alcancen la temperatura ambiente (22°C a 28°C) y mezcle invirtiendo o revolviendo suavemente. Evite las muestras marcadamente lipémicas o hemolizadas.

VII. PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

Almacene todos los componentes del kit a 2-8 °C.

1. Todos los reactivos, excepto los calibradores, los controles de kit y el concentrado de lavado, están listos para usar. Almacene todos los reactivos a 2-8 °C.
2. En el Calibrador cero (Calibrador A), reconstituya el vial con 4 mL de agua destilada o desionizada y mezcle. En cada uno de los calibradores que no sean cero (del Calibrador B al F) y en los controles 1 y 2 del kit, reconstituya cada vial con 2 mL de agua destilada o desionizada y mezcle. Permita que los viales reposen 10 minutos y luego mezcle por completo, invirtiendo el envase con cuidado para obtener la reconstitución completa. **Utilice los calibradores y los controles lo antes posible luego de la reconstitución. Congele (a -15°C) los calibradores y los controles restantes lo antes posible luego de utilizarlos.** Los estándares y los controles permanecen estables a -15°C durante 6 semanas luego de la reconstitución, con un máximo de 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento cuando se manipulan según lo recomendado en la sección “Notas de procedimiento”.
3. **ELISA Reactivo A:** Concentrado de lavado: Mezcle el contenido del concentrado de lavado por completo. Si el mismo presenta signos de precipitación debido al almacenamiento a una temperatura menor, como podría ser 4°C, disuélvalo colocando el vial a baño María o en el horno a 37°C y revuélvalo. Agregue el concentrado de lavado (30 mL) a 570 mL de agua destilada o desionizada y mezcle. La solución de lavado diluida permanece estable por 90 días cuando la misma se almacena a temperatura ambiente.

VIII. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

1. Coloque una cantidad suficiente de Tiras recubiertas de estreptavidina en un soporte para ejecutar la totalidad de los seis (6) calibradores de EPO, del Calibrador A al F de los CALIBRADORES DE EPO [la concentración exacta se indica en la etiqueta del vial], los controles y las muestras de pacientes. Como mínimo designe dos pocillos para que sirvan como “pocillos de blanco”. Referirse al paso 9 para la lectura final de placa.
2. Coloque **200 µL** de los calibradores, los controles y las muestras en una pipeta y viértala en el pocillo designado o asignado. **Congele (a -15°C) los calibradores y los controles restantes lo antes posible luego de utilizarlos.**
3. Agregue o vierta 25 µL del Reactivo 1 (Anticuerpo biotinilado) en cada uno de los pocillos que ya contengan los calibradores, los controles y las muestras.
4. Agregue o vierta 25 µL del Reactivo 2 (Anticuerpo marcado con enzimas) en los mismos pocillos. Golpee ligeramente la microplaca contra un objeto rígido, como una lapicera, para lograr una mezcla adecuada de la muestra con los reactivos. Para garantizar una mezcla adecuada, repita los golpecitos 5 veces más como mínimo con cada uno de los tres lados restantes de la placa. Proceda con cuidado para evitar derrames. Cubra la o las microplacas con una bandeja o una película de aluminio para evitar la exposición a la luz y colóquelas en un **agitador** preparado a la configuración recomendada (consulte la sección **IV**) durante **2 horas ± 15 minutos** a temperatura ambiente (22-28°C).

5. Primero, aspire el fluido completamente y luego lave/aspire cada pocillo cinco (5) veces con la solución de lavado activa (preparada a partir del Reactivo A), utilizando una lavadora de micropocillos automática. El volumen de solución de lavado debe prepararse para verter 0,35 mL en cada pocillo.
6. Agregue o vierta **150 µL** de la prueba **ELISA Reactivo B** (sustrato TMB) en cada uno de los pocillos. Golpee suavemente la microplaca como se describe en el Paso N° (4).
7. Con una cubierta adecuada para evitar la exposición a la luz, coloque la o las microplacas en un **agitador** preparado a la configuración recomendada (consulte la sección **IV**) durante **30 ± 5 minutos** a temperatura ambiente (22-28°C).
8. Agregue o vierta **100 µL** de la solución de parada en cada uno de los pocillos. Golpee suavemente la microplaca como se describe en el Paso N° (4). Proceda con cuidado para evitar derrames.
9. Lea la absorbancia de la solución en los pocillos dentro de los 10 minutos, utilizando un lector de micropocillos establecido en 450 nm. Antes de la lectura, asegúrese de que ambos “pocillos de blanco” mencionados en el punto 1, estén llenos con 250 µL de agua destilada o desionizada. Lea la placa nuevamente con el lector establecido en 405 nm contra agua destilada o desionizada.
Nota: La segunda lectura tiene como objetivo extender la validez analítica de la curva de calibración al valor aproximado de 450 mIU/mL, representado por el calibrador más alto (la concentración exacta se encuentra impresa en la etiqueta del vial y presentará mínimos cambios de un lote a otro). Por lo tanto, las muestras de pacientes con EPO son > al penúltimo calibrador (el 2° más alto). Es decir que el Calibrador E puede cuantificarse contra una curva de calibración que consista en las lecturas ascendentes hasta alcanzar la concentración equivalente al calibrador más alto, utilizando la lectura de 405 nm, lejos de la longitud de onda de absorbancia máxima. Las muestras de pacientes y controles para la determinación de las concentraciones de EPO que alcancen la concentración del Calibrador E deben leerse utilizando la lectura de 450 nm. Las lecturas de concentraciones de EPO superiores a la del Calibrador E deben interpolarse utilizando la lectura de 405 nm.
10. Con los valores de absorbancia finales obtenidos en el paso anterior, trace dos curvas de calibración utilizando una lectura de 405 nm y una lectura de 405 nm mediante una spline cúbica, una logística de 4 parámetros o una interpolación punto a punto para cuantificar la concentración de EPO.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

- Las muestras con valores inferiores al límite de detección (1,1 mIU/mL) deben informarse como “< 1,1 mIU/mL”.
- Se recomienda analizar la totalidad de los calibradores, los controles y las muestras de pacientes por duplicado, hasta que el analista o el técnico haya obtenido suficiente experiencia (como lo demuestra el coeficiente de duplicación de variación inferior al 10% [excepto para los valores inferiores al 2° estándar más bajo distinto de cero] y la capacidad para obtener resultados para los controles del kit dentro de los intervalos aceptables).
- Las muestras deben colocarse en pipetas y verterse en el pocillo con una mínima cantidad de burbujas de aire.
- Las muestras de pacientes con valores superiores al calibrador más alto (Calibrador F), que es de 450 mIU/mL aproximadamente (vea la concentración exacta en la etiqueta del vial, ya que la misma puede variar de un lote al otro), deben diluirse con el Calibrador A (Calibrador cero) y volver a analizarse. Multiplique el resultado por el factor de dilución. Alternativamente, el resultado puede ser superior a la concentración del calibrador más alto (Calibrador F). Por ejemplo, si el Calibrador F tiene un valor de EPO asignado de 494 mIU/mL, el informe debe indicar “> 494 mIU/mL”.
- Los reactivos de números de lote diferentes no deben intercambiarse.
- Si lo prefiere, mezcle el Reactivo 1 (anticuerpo biotinilado) y el Reactivo 2 (anticuerpo marcado con enzimas) en una botella ámbar limpia empleando a tal fin volúmenes iguales y cantidades suficientes para el análisis. El reactivo combinado se mantiene estable por siete (7) días si se almacena a 4°C. Luego, vierta 50 µL del anticuerpo mezclado en cada pocillo. Este método alternativo debe reemplazar al Paso (3) y (4), seguido por la incubación.
- Al mezclar, evite salpicar los reactivos fuera de los pocillos. Esto afectará la precisión y la exactitud del análisis.

IX. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Método manual

1. Para las lecturas de 450 nm, dibuje una curva dosis-respuesta (curva de calibración) utilizando los primeros cinco calibradores suministrados, es decir, los Calibradores A, B, C, D y E. Para las lecturas de 405 nm, dibuje una segunda curva dosis-respuesta utilizando los Calibradores D, E y F.

Dibuje una curva dosis-respuesta (curva de calibración) utilizando Calibradores A, B, C, D y E.

2. Asigne la concentración para cada calibrador indicada en el vial en mIU/mL Trace los datos de la curva de calibración en papel milimetrado para gráficos con la concentración en el eje X y la unidad de absorbancia en el eje Y.
3. Dibuje una línea recta entre 2 puntos adyacentes. Este algoritmo matemático se conoce comúnmente como el cálculo “punto a punto”. Obtenga la concentración de la muestra ubicando la unidad de absorbancia en el eje Y y buscando el valor

de concentración correspondiente en el eje X. Las muestras de control y las muestras de pacientes deben leerse utilizando la lectura de 450 nm para las concentraciones de EPO hasta el penúltimo calibrador [2° calibrador más alto], es decir el Calibrador E. Las concentraciones de EPO superiores a la concentración del penúltimo calibrador (156 mIU/mL en el ejemplo incluido a continuación) deben interpolarse utilizando la lectura de 405 nm.

Método automático:

- Los programas informáticos que utilizan la spline cúbica, 4 PL [Logística de 4 parámetros] o el cálculo punto a punto pueden resultar adecuados. Para las lecturas de 450 nm, dibuje una curva dosis-respuesta (curva de calibración) utilizando los primeros cinco calibradores suministrados, es decir, los Calibradores A, B, C, D y E. Para las lecturas de 405 nm, dibuje una segunda curva dosis-respuesta utilizando los Calibradores D, E, y F. Dibuje una curva dosis-respuesta (curva de calibración) utilizando Calibradores A, B, C, D, y E.

Datos de muestra a 450 nm [lectura de unidad de absorbancia bruta contra agua destilada o desionizada]

Pocillo de microplaca	Unidad de absorbancia de 1ª lectura	Unidad de absorbancia de 2ª lectura	Unidad de absorbancia promedio	EPO mIU/mL
Calibrador A	0,006	0,006	0,006	0
Calibrador B	0,094	0,092	0,093	10,3
Calibrador C	0,232	0,219	0,226	24,8
Calibrador D	0,509	0,474	0,492	48
Calibrador E	1,918	1,799	1,859	156
Control 1	0,171	0,170	0,171	18,2
Control 2	2,270	2,200	2,240	184
Muestra de paciente 1	0,012	----	0,012	1,1
Muestra de paciente 2	0,031	----	0,031	3,2
Muestra de paciente 3	0,089	----	0,089	9,6
Muestra de paciente 4	0,508	----	0,508	50,1
Muestra de paciente 5	3,283	----	3,283	>156*

* Debido a que la concentración de estas muestras es > a la concentración del Calibrador E, por ejemplo 156 mIU/mL, se recomienda utilizar los datos obtenidos en la lectura de 405 nm, como se muestra en los Datos de muestra a 405 nm en la tabla a continuación.

Datos de muestra a 405 nm [lectura de unidad de absorbancia bruta contra agua destilada o desionizada]

Pocillo de Microplaca	Unidad de absorbancia de 1ª lectura	Unidad de absorbancia de 2ª lectura	Unidad de absorbancia promedio	EPO mIU/mL
Calibrador A	0,000	0,000	0,000	0
Calibrador D	0,140	0,130	0,135	48
Calibrador E	0,538	0,508	0,523	156
Calibrador F	2,060	2,030	2,040	523
Control 1	0,046	0,044	0,045	<156**
Control 2	0,649	0,626	0,638	184
Muestra de paciente 1	0,000	----	0,000	<156**
Muestra de paciente 2	0,007	----	0,007	<156**
Muestra de paciente 3	0,023	----	0,023	<156**
Muestra de paciente 4	0,140	----	0,140	<156**
Muestra de paciente 5	1,161	----	1,161	302

** Para las muestras con concentraciones < a la concentración del Calibrador E, por ejemplo 156 mIU/mL, se recomienda utilizar los datos obtenidos en la lectura de 450 nm, como se muestra en los Datos de muestra a 450 nm en la tabla anterior. Esta práctica debe producir los resultados con óptima sensibilidad del análisis. **NOTA: Los datos presentados sólo tienen fines de ilustración y no deben utilizarse en lugar de los datos generados durante el análisis.**

X. CONTROL DE CALIDAD

Las muestras de control o los grupos de sueros deben analizarse con cada ejecución de los calibradores y las muestras de pacientes. Los resultados generados a partir del análisis de las muestras de control deben evaluarse para su aceptación utilizando los métodos estadísticos adecuados. Cuando el laboratorio introduce por primera vez este análisis de EPO, la publicación de los resultados de las muestras de pacientes deben realizarse según los resultados de control de kit se encuentren dentro de los intervalos aceptables sugeridos. Si uno o más de los valores de muestras de control de calidad se encuentran fuera de los límites aceptables, el análisis debe repetirse. Una vez que el laboratorio ha generado datos propios, los parámetros de control de calidad deben basarse en los datos estadísticos del laboratorio, utilizando los controles del kit y/o los grupos de sueros elaborados por el laboratorio. Deben utilizarse los diagramas de Levy-Jenning sobre resultados de control. Si los resultados de todas las muestras de control se encuentran dentro de las desviaciones estándar medias de + 2, sin tendencias definitivas ni sesgo de los datos de control de calidad, el análisis debe considerarse aceptable. Se debe seguir la regla de Westgard a fin de cumplir con las regulaciones de CLIA 88. Si los resultados de control no se incluyen dentro de los parámetros establecidos descritos, los resultados del análisis no serán válidos.

XI. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

A semejanza de lo que sucede con cualquier analito utilizado como adjunto diagnóstico, los resultados de EPO deben interpretarse cuidadosamente con las presentaciones clínicas generales y otras pruebas de diagnóstico complementarias.

Se han incorporado a los reactivos las proteínas IgG purificadas de la misma especie que las proteínas para las que se derivaron los anticuerpos de captura y etiqueta, además de un bloqueador de anticuerpos heterófilos comercial a fin de minimizar estos anticuerpos.¹⁴ No obstante, no hay garantías de la eliminación completa de la interferencia heterófila. Por lo tanto, se recomienda analizar tres diluciones como mínimo de todo resultado elevado y/o potencialmente positivo para detectar ausencia de paralelismo comparado con los estándares de referencia.¹⁵

Debido a que los resultados obtenidos con un análisis de EPO comercial pueden diferir significativamente de los obtenidos con otro tipo de análisis, se recomienda que toda prueba en serie realizada en el mismo paciente durante un período de tiempo se lleve a cabo con la misma prueba EPO comercial.¹⁶ Es posible que esta prueba no sea lo suficientemente sensible para discriminar coherentemente los valores de EPO inferiores anormales de los niveles de EPO normales.

Los niveles de EPO inferiores a lo previsto se han presentado en anemias asociadas a las siguientes enfermedades: artritis reumatoidea, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, cáncer, colitis ulcerosa¹⁷, drepanocitosis, presentándose también en neonatos prematuros.¹⁸ Luego de un trasplante allogenico de médula ósea, una respuesta inadecuada de la eritropoyetina puede demorar la recuperación de la misma.¹⁷

Los pacientes con hipergammaglobulinemia asociada con el mieloma múltiple o la enfermedad de Waldenström tienen una producción deficiente de eritropoyetina en relación con la concentración de hemoglobina. Esto se ha vinculado a una mayor viscosidad del plasma.¹⁷ No se ha investigado ninguna droga en relación con interferencias en el análisis. Los niveles de EPO en personas con eritrocitosis que viven en lugares montañosos de gran altitud pueden normalizarse rápidamente luego de regresar a lugares bajos.¹⁹

Los suplementos que contienen niveles altos de biotina, como los que se comercializan para el cuidado del pelo, la piel y las uñas, pueden contener cantidades interferentes de biotina. Unos niveles más altos de biotina que la dosis diaria recomendada pueden causar interferencias con el ensayo. Por lo tanto, es importante comunicarse con los profesionales sanitarios y con los pacientes sobre la dosis de biotina al recoger las muestras para evitar resultados de pruebas incorrectos.

XII. VALORES PREVISTOS

Los niveles de EPO se midieron en 120 personas aparentemente normales en EE.UU. con la Prueba ELISA para EPO de Biomerica. Las muestras se realizaron en 61 hombres y 59 mujeres, de 18 a 96 años de edad. No existe una diferencia estadística significativa en los intervalos de referencia obtenidos a partir de los datos de hombres y mujeres. Este descubrimiento, que no muestra diferencia alguna entre los dos géneros, coincide con lo presentado en la documentación²¹. Además, los valores de EPO no parecen depender demasiado de la edad, excepto que los valores más altos se hayan obtenido en muestras obtenidas en las primeras fases de la edad adulta (es decir, aproximadamente a los 22 a 42 años de edad). Al utilizar el método no paramétrico para el análisis de valores de referencia presentados en la publicación de NCCLS "How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory" (Cómo definir, determinar y utilizar los intervalos de referencia en el laboratorio clínico) (Documento de NCCLS C28-A, Vol. 15 N° 4), los intervalos de referencia (2,5 – 97,5 percentiles) fueron de 3,22-31,9 mIU/mL para la EPO en suero. Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo de valores normales previstos.

"En pacientes con eritrocitosis provocada por hipoxia no compensada, la EPO inmunoreactiva en suero es elevada; en pacientes con hipoxia compensada, el nivel de EPO inmunoreactiva en suero generalmente se encuentra dentro del intervalo normal y en pacientes con policitemia vera, la EPO inmunoreactiva en suero es normal o baja. Por lo tanto, mientras un nivel de EPO en suero elevado sugiere que la eritrocitosis es un fenómeno secundario y un nivel de EPO bajo incluye la posibilidad de eritropoyesis autónoma, un nivel de EPO normal excluye a la hipoxia y a la producción de EPO autónoma como causa de la eritrocitosis".²⁰

XIII. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Precisión

Se analizaron ochenta y cinco (85) muestras de pacientes, con valores de EPO entre 3,8 y 304 mIU/mL mediante el procedimiento ELISA de Biomerica y un kit de EPO para ELISA. El análisis de regresión lineal brinda las siguientes estadísticas:

$$\begin{aligned} \text{Prueba ELISA de Biomerica} &= 0,94 \text{ kit ELISA } -0,41 \text{ mIU/mL} \\ r &= 0,989 \quad N = 85 \end{aligned}$$

Sensibilidad

La sensibilidad o el límite de detección mínimo de este análisis se define como el valor individual menor, que puede distinguirse de cero en el límite de confianza de 95%. La prueba ELISA para EPO de Biomerica tiene una sensibilidad calculada de 1,1 mIU/mL. Por lo tanto, los resultados de muestras de pacientes inferiores a 1,1 mIU/mL deben informarse como "Inferiores a 1,1 mIU/mL".

Precisión y reproducibilidad

La precisión intraanálisis de la prueba ELISA para EPO de Biomerica se calculó a partir de 22 determinaciones repetidas en cada una de las dos muestras.

Variación intraanálisis

Muestra	Valor medio (mIU/mL)	Nº	Coefficiente de variación
A	14,4	22	8,4
B	189	22	4,8

La precisión interanálisis de la Prueba ELISA para EPO de Biomerica se calculó a partir de los datos de dos muestras obtenidos en 22 análisis diferentes.

Variación interanálisis

Muestra	Valor medio (mIU/mL)	Nº	Coefficiente de variación
A	20,4	22	8,8
B	183	22	5,1

Especificidad y reactividad cruzada

La reactividad cruzada en la EPO se estudió mediante la incorporación de diversas sustancias al Calibrador cero (Calibrador A).

Reactantes cruzados	Cantidad de reactantes cruzados añadidos
Transferrina humana	400 µg/mL
Bilirrubina humana (no conjugada)	200 µg/mL
Hemoglobina humana	5 mg/mL
Globulina α humana	60 mg/mL
Macroglobulina α ₂ humana	500 µg/mL
Glucoproteína ácida α 1 humana,	800 µg/mL
Antitripsina α 1 humana	500 µg/mL
Triglicéridos	30 mg/mL
Albumina humana	60 mg/mL
Gammaglobulina humana	60 mg/mL
ACTH (molécula intacta: secuencia de aminoácidos 1-39)	5000 pg/mL
TSH (tirotrópina)	100 µIU/mL

Ninguno de los reactantes cruzados interfiere con esta prueba ELISA para EPO en las concentraciones estudiadas. Los cambios mínimos observados en la EPO ante algunos reactantes cruzados se encontraban dentro de los límites estadísticos de la variación intraanálisis.

Recuperación

Se agregaron diversas cantidades de EPO a cuatro sueros de pacientes diferentes para determinar la recuperación. Los resultados se describen en la siguiente tabla:

Muestra de Suero	EPO Endógeno (mIU/mL)	EPO Añadida (mIU/mL)	Valor Previsto (mIU/mL)	Valor Medido (mIU/mL)	Recuperación (%)
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%

Linealidad de diluciones en muestras de pacientes: Paralelismo

Tres muestras de sueros de pacientes se diluyeron con el Calibrador A (Calibrador 0). A continuación, se muestran los resultados en mIU/mL:

Muestra	Dilución	Valor Previsto	Valor Observado	% del Valor Observado ÷ Previsto
A	Sin diluir	-	247,0	-
	1:2	123,5	119,0	96%
	1:4	61,8	58,5	95%
	1:8	30,9	28,8	93%
B	Sin diluir	-	139,0	-
	1:2	69,5	74,0	106%
	1:4	34,8	39,9	114%
	1:8	17,4	19,8	114%
C	Sin diluir	-	>500,0	-
	1:2	-	253,0	-
	1:4	126,5	116,0	92%
	1:8	63,3	57,0	90%

Efecto gancho de alta dosis

El kit ELISA para EPO de Biomerica no ha exhibido ningún "efecto gancho de alta dosis" en diluyentes estándar con 200,000 mIU/mL de EPO. Además, tres muestras con valores de EPO altos conocidos (1920 mIU/mL, 1520 mIU/mL y 966 mIU/mL) se probaron sin dilución y sus resultados excedieron ampliamente el estándar más alto. Sin embargo, las muestras con niveles de EPO mayores que el calibrador más alto deben diluirse y volver a analizarse para obtener los valores correctos.

- 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. SÍMBOLOS

	Temperatura del almacenamiento
	Código de la serie
	Vencimiento
	Fabricante
	Representante autorizado
	Cuidado, vea las instrucciones
	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	N. catalogo

XVI. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

PEDIDOS:



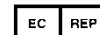
Envíe su pedido de compra a:
BIOMERICA, INC.
 17571 Von Karman Avenue
 Irvine, CA 92614
 U.S.A.
 Teléfono: (949) 645-2111
 FAX: (949) 553-1231
 Sitio web: www.biomerica.com
 Correo electrónico: bmra@biomerica.com

2°C / 8°C



Teléfono:
 FAX:
 Sitio web:
 Correo electrónico:

67025-14_spa.doc



mayo 2018

de acuerdo con IVDD 98/79/ EC
MDSS GmbH
 Schiffgraben 41
 D-30175 Hannover
 Alemania

XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Sawyer, S.T., Krantz, S.B., Sawada, K. *Receptors for Erythropoietin in Mouse and Human Erythroid Cells and Placenta*. **Blood** 1989; 74: 103-109.