



Instructions for Use

EPO (Erythropoietin) ELISA

IVD



REF EIA-3646

Σ 96



DRG

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de



DRG

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.

Table of Contents

1	NAME AND INTENDED USE.....	2
2	SUMMARY AND EXPLANATION	2
3	PRINCIPLE OF THE TEST	2
4	KIT COMPONENTS.....	3
5	WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS	3
6	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE.....	4
7	REAGENT PREPARATION AND STORAGE	4
8	ASSAY PROCEDURE	5
9	CALCULATION OF RESULTS.....	6
10	QUALITY CONTROL	7
11	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	7
12	EXPECTED VALUES.....	7
1	VERWENDUNGSZWECK.....	10
2	ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG	10
3	TESTPRINZIP	10
4	TESTKIT-KOMPONENTEN	11
5	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	11
6	PROBENENTNAHME UND LAGERUNG	12
7	VORBEREITUNG DER REAGENZIEEN UND LAGERUNG	12
8	TESTVERFAHREN	13
9	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	14
10	QUALITÄTSKONTROLLE.....	15
11	GRENZEN DES VERFAHRENS.....	15
12	ERWARTETE WERTE.....	16
13	LEISTUNGSMERKMALE.....	16
14	REFERENCES / LITERATURE.....	19
	SYMBOLS USED.....	20

1 NAME AND INTENDED USE

The EPO ELISA is intended for *in vitro* diagnostic use in the quantitative determination of Erythropoietin (EPO) in human serum. This assay is intended to be used to detect elevated or decreased EPO level in human serum, in aid to diagnosis of anemias and polycythemias for professional use.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

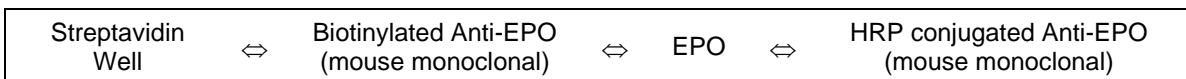
Erythropoietin (EPO) is a heavily glycosylated protein with a molecular weight of about 30,000 - 34,000 Daltons. Human EPO is a polypeptide consisting of 165 amino acids, containing one O-linked and three N-linked carbohydrate chains [1]. The recombinant EPO is a good substitute for the native protein for use in an immunoassay [2]. Serum EPO levels are dependent on the rate of production and the rate of clearance of the protein. Ninety percent of EPO is produced in the peritubular cells of the adult kidney in response to a decrease in tissue oxygenation [3,4]. There is evidence indicating that the protein on these cells which detects oxygen saturation of the blood is a heme-containing moiety [5]. As the pO₂ of the plasma, a function of the hematocrit decreases, EPO concentration will increase [6]. There are also observations suggesting that normally there is an inverse correlation between serum EPO levels and red blood cell mass [7].

Quantitation of serum erythropoietin concentration serves as a diagnostic adjunct in determining the cause of anemia or erythrocytosis. Aplastic anemia, hemolytic anemia and anemia due to iron deficiency all result in serum EPO elevation. Whereas, EPO levels in patients with secondary anemia due to renal failure and other disorders such as acquired immune deficiency syndrome (AIDS) are generally inappropriately low for the degree of anemia. This is mostly likely caused by an impaired ability of the diseased kidney to produce adequate quantities of EPO [8]. Low concentrations of EPO may give an early warning of kidney transplant rejection [10]. EPO also can be used to monitor AIDS patients undergoing Zidovudine (AZT) therapy. An increased concentration of EPO verifies that anemia associated with AZT therapy is due to red cell hypoplasia or aplasia [10].

Polycythemia rubra vera, or primary erythrocytosis (an increase of red blood cell mass) results from unstimulated over production of erythrocytes. Hence, the increase in the hemoglobin causes decreased production of EPO, which results in subnormal levels of serum EPO [9]. Secondary polycythemias, which are also characterized by an increase in the total red blood cell mass, occur as a physiological response to elevated levels of circulatory EPO caused by tissue hypoxia. The hypoxia may be due to such factors as pulmonary fibrosis, cardiovascular disease, prolonged exposure to high altitude, abnormal forms of hemoglobin or drug treatment [10]. Some tumors produce EPO and, in these cases, EPO may be used as a tumor marker to monitor the effectiveness of treatment.

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG EPO Immunoassay is a two-site ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay] for the measurement of the biologically active 165 amino acid chain of EPO. It utilizes two different mouse monoclonal antibodies to human EPO specific for well-defined regions on the EPO molecule. One mouse monoclonal antibody to human EPO is biotinylated and the other mouse monoclonal antibody to human EPO is labeled with horseradish peroxidase [HRP] for detection.



In this assay, calibrators, controls, or patient samples are simultaneously incubated with the enzyme labeled antibody and a biotin coupled antibody in a streptavidin-coated microplate well.

At the end of the assay incubation, the microwell is washed to remove unbound components and the enzyme bound to the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stopping solution is then added to stop the reaction and converts the color to yellow.

The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of EPO in the sample. A dose response curve of absorbance unit vs. concentration is generated using results obtained from the calibrators. Concentrations of EPO present in the controls and patient samples are determined directly from this curve.

The DRG standards have been calibrated against the World Health Organization (WHO) erythropoietin international standard that consists of recombinant DNA derived EPO.

The WHO reference standard used was erythropoietin 1st international standard (87/684).

4 KIT COMPONENTS

Kit Components	Description	Quantity
RGT 1 = Reagent 1	Biotinylated EPO Antibody [mouse monoclonal anti human EPO] containing ProClin 300 as preservative	1 x 3.5 mL
RGT 2 = Reagent 2	Peroxidase (Enzyme) labeled EPO Antibody [mouse monoclonal anti human EPO]	1 x 3.5 mL
RGT A = Reagent A	ELISA Wash Concentrate [Saline with surfactant with the preservative ciprofloxacin hydrochloride]	1 x 30 mL
RGT B = Reagent B	TMB Substrate [tetramethylbenzidine]	1 x 20 mL
SOLN = Stop Solution	ELISA Stop Solution [1 N sulfuric acid]	1 x 20 mL
PLA = Microplate	One holder with Streptavidin Coated Strips.	12 x 8-well strips
CAL = Calibrators A: 0 mIU/mL B – F: Refer to vial labels for exact concentrations	Lyophilized synthetic h-EPO. Lyophilized Zero calibrator is a buffered protein solution and all other calibrators consist of synthetic h-EPO (1-165) in buffered protein solution. These standards have been calibrated against the World Health Organization erythropoietin 1 st international standard [recombinant DNA derived EPO] (87/684). Each calibrator contains the preservative ciprofloxacin hydrochloride	1 x 4 mL for the zero calibrator 1 x 2 mL for all other calibrators
CTRL = Control 1 & 2 Refer to vial labels for exact ranges	Lyophilized. 2 Levels. Synthetic h-EPO (1-165) in a buffered protein solution. Each control contains the preservative ciprofloxacin hydrochloride	1 x 2 mL per level

4.1 Materials and equipment required but not provided

- Microplate reader capable of reading at 450 nm and 405 nm.
- Microplate washer [if washer is unavailable, manual washing is acceptable].
- Precision Pipettors to deliver 25, 200, 100 and 150 µL.
- (Optional): A multi-channel dispenser or a repeating dispenser for 25, 100 and 150 µL.
- Timer capable of ± 2 minute accuracy.
- Distilled or deionized water.
- Microplate Shakers: DRG has found for shaker diameters indicated below, the Streptavidin kits will maintain optimal performance response at the following speed settings:

Microplate Shakers	Shaking diameter	Speed setting
Orbital	3 mm (0.1118 in)	600 ± 10 rpm
	19 mm (0.75 in)	170 ± 10 rpm
Linear	25 mm (0.98 in)	170 ± 10 rpm

5 WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS

Safety Data Sheets (SDS) are available upon request.

CAUTION POTENTIAL BIOHAZARD

Although the reagents provided in this kit has been specifically designed to contain no human blood components, the human patient samples, which might be positive for HBsAg, HBcAg or HIV antibodies, must be treated as potentially infectious biohazard. Common precautions in handling should be exercised, as applied to any untested patient sample.

CAUTION

This device contains material of animal origin and should be handled as a potential carrier and transmitter of disease.

Stopping Solution consists of 1 N Sulfuric Acid. This is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves and eye protection and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation. Use only in well-ventilated areas.

ELISA Reagent 1

Biotinylated EPO Antibody contains ProClin 300 as a preservative. Avoid contact and wear gloves while handling with this reagent. Promptly wash skin with mild soap and water if accidental skin contact should occur. Flush eyes with water for 15 minutes, if reagent should be in contact with eye(s). If ingested, avoid vomiting and give large amount of water. Contact a physician immediately.

ELISA Reagent A, Wash Concentrate, and EPO Calibrators and Controls

all contain ciprofloxacin hydrochloride as a preservative. Keep from personnel who have demonstrated sensitivity to Quinoline based drug products. Females who are, or may be pregnant should avoid any contact with Ciprofloxacin.

If turbidity is observed in any reagent, do not perform assay and please contact your supplier.

Various types of shakers with different specifications are commercially available. In the event that the microplate shaker does not fall within the specified range above, each laboratory is encouraged to set their own optimal range.

6 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The determination of EPO should be performed on human serum.

To assay the specimen in duplicate, 400 µL of human serum is required.

It is highly recommended that the specimen be collected between 7:30 a.m. to 12:00 noon, because diurnal variation of erythropoietin has been reported in literature [11,12].

Collect whole blood without anticoagulant and allow blood to clot between 2 °C - 8 °C, if possible. It has been reported that serum samples clotted at room temperature (22 °C - 28 °C) caused a decrease in EPO value as assessed by radioimmunoassay of about 30% over clotting on ice [13]

Then, the serum should be promptly separated, preferably in a refrigerated centrifuge, and stored at -15 °C or lower.

Serum samples may be stored up to 24 hours at 2 °C - 8 °C.

Serum samples frozen at -15 °C are stable for up to 12 months. Do not store samples in self-defrosting freezers.

Avoid repeated freezing and thawing of samples. For long term storage of samples, it is recommended that samples should be aliquoted into sample tubes or vials prior to freezing.

Prior to use, allow all specimens to come to room temperature (22 °C - 28 °C) and mix by gentle inversion or swirling.

Avoid grossly hemolyzed or grossly lipemic samples.

7 REAGENT PREPARATION AND STORAGE

Store all kit components at 2 °C - 8 °C.

1. All reagents except the calibrators, kit controls and the Wash Concentrate are ready-to-use.
Store all reagents at 2 °C - 8 °C.
2. For **Zero Calibrator** (Calibrator A) reconstitute vial with 4 mL of distilled or deionized water and mix.
For each of the **non-zero calibrators** (Calibrator B through F) and **kit controls** 1 and 2, reconstitute each vial with 2 mL of distilled or deionized water and mix.
Allow the vials to stand for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Use the calibrators and controls as soon as possible upon reconstitution. Freeze (-15 °C) the remaining calibrators and controls as soon as possible after use.** Standards and controls are stable at -15 °C for 6 weeks after reconstitution with up to 3 freeze thaw cycles when handled as recommended in "Procedural Notes" section.
3. **ELISA Reagent A (Wash Concentrate)**
Mix contents of wash concentrate thoroughly. If precipitate is present in the Wash Concentrate due to storage at lower temperature such as 4 °C, dissolve by placing the vial in a 37 °C water bath or oven with swirling or stirring.
Add wash concentrate (30 mL) to 570 mL of distilled or deionized water and mix. The diluted working wash solution is stable for 90 days when stored at room temperature.

8 ASSAY PROCEDURE

1. Place sufficient **Streptavidin Coated Strips** in a holder to run all six (6) calibrators, A - F of the EPO CALIBRATORS [Exact concentration is stated on the vial label], Controls and patient samples.
At a minimum, designate two wells to serve as "blanks". Refer to Step 9 for final plate reading.
2. Pipet **200 µL** of calibrators, controls and samples into the designated or mapped well.
Freeze (-15 °C) the remaining calibrators and controls as soon as possible after use.
3. Add or dispense **25 µL** of Reagent 1 (Biotinylated Antibody) into each of the wells which already contain the calibrators, controls, and samples.
4. Add or dispense **25 µL** of Reagent 2 (Enzyme Labeled Antibody) into each of the same wells. Tap the microplate firmly against a rigid object, such as a pen, to achieve thorough mixing of the sample with Reagents. For complete assurance of mixing, repeat the tapping for a minimum of 5 times for each of the remaining three of the four sides of the plate. Be careful to avoid spillage.
Cover the microplate(s) with aluminum foil or a tray to avoid exposure to light, and place it on shaker set at recommended settings (see section 4.1) **for 2 hours ± 15 minutes** at room temperature (22 °C - 28 °C).
5. First aspirate the fluid completely and then wash/aspirate each well **five (5) times** with the Working Wash Solution (prepared from Reagent A), using an automatic microplate washer. The wash solution volume should be set to dispense 0.35 mL into each well.
6. Add or dispense **150 µL** of Reagent B (TMB Substrate) into each of the wells, except the blank wells. Tap the microplate as described in step 4.
7. With appropriate cover to avoid light exposure, place the microplate(s) on a **shaker** set at recommended settings (see section 4.1) for **30 ± 5 minutes** at room temperature (22 °C - 28 °C).
8. Add or dispense **100 µL** of the Stopping Solution into each of the wells, except the blank wells. Tap the microplate as described in Step 4. Be careful to avoid spillage. Wipe underside of wells with lint-free tissue.
9. Prior to reading, ensure both "blank wells" as mentioned in Step 1 are filled with 250 µL of distilled or deionized water. Blank the plate reader according to the manufacturer's instructions by using the blank wells.* Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to **450 nm**.
Read the plate again with the reader set to **405 nm** against distilled or deionized water.

* If due to technical reasons the ELISA plate reader cannot be adjusted to zero using "blank," subtract the "blank," absorbance value from all other absorbance values to obtain results.

Note: The second reading is designed to extend the analytical validity of the calibration curve to the value represented by the highest calibrator, which is approximately 450 mIU/mL (the exact concentration is printed on the vial label and will change slightly from one lot to another). Hence, patient samples with EPO > the penultimate [2nd to the highest] calibrator, i.e. Calibrator E, can be quantified against a calibration curve consisting of the readings all the way up to the concentration equivalent to the highest calibrator using the 405 nm reading, away from the wavelength of maximum absorbance. Patient and control samples should be read using the 450 nm for EPO concentrations up to the concentration of Calibrator E. EPO concentrations reading above that of Calibrator E should be interpolated using the 405 nm reading.

10. By using the final absorbance values obtained in the previous step, construct two calibration curves using 405 nm reading and 450 nm reading via cubic spline, 4 parameter logistics, or point-to-point interpolation to quantify the concentration of EPO.

8.1 Procedural Notes

- Samples that have values below the limit of detection (1.1 mIU/mL) should be reported as "< 1.1 mIU/mL".
- It is recommended that all calibrators, controls, and patient samples are assayed in duplicate, until the analyst or technician has gained sufficient experience (as evidenced by the coefficient of variation duplicate being less than 10% [except for the values below the 2nd non-zero lowest standard] and the ability to obtain results for the kit controls within the suggested acceptable ranges).
- The samples should be pipetted into the well with minimum amount of air-bubble.
- Patient samples with values greater than the highest calibrator (Calibrator F), which is approximately 450 mIU/mL (see exact concentration on vial label, because it can vary from one lot to another), must be diluted with Calibrator A (Zero Calibrator) and re-assayed. Multiply the result by the dilution factor. Alternatively, the result may be reported as greater than the highest calibrator concentration (Calibrator F).
For example, if the Calibrator F has an assigned EPO value of 494 mIU/mL, the report should be "> 494 mIU/mL".
- Reagents from different lot numbers must not be interchanged.
- If preferred, mix in equal volumes, in sufficient quantities for the assay, Reagent 1 (Biotinylated Antibody) and Reagent 2 (Enzyme Labeled Antibody) in a clean amber bottle. The combined reagent is stable for seven (7) days when stored at 4 °C. Then use 50 µL of the mixed antibody into each well. This alternative method should replace Step (3) and (4), to be followed with the incubation.
- When mixing avoid splashing of reagents from wells. This will affect assay precision and accuracy.

9 CALCULATION OF RESULTS

9.1 Manual Method

- For the 450 nm readings, construct a dose response curve (calibration curve) using the first five calibrators provided, i.e. Calibrators A, B, C, D and E. For the 405 nm readings, construct a second dose response curve using Calibrators A, D, E and F.
Construct a dose response curve (calibration curve) using Calibrators A, B, C, D and E.
- Assign the concentration for each calibrator stated on the vial in mIU/mL. Plot the data from the calibration curve on linear graph paper with the concentration on the X-axis and the corresponding A.U. on the Y-axis.
- Draw a straight line between 2 adjacent points. This mathematical algorithm is commonly known as the "point-to-point" calculation. Obtain the concentration of the sample by locating the absorbance unit on the Y-axis and finding the corresponding concentration value on the X-axis. Patient and control samples should be read using the 450 nm for EPO concentrations up to the penultimate [2nd to the highest] calibrator, i.e. Calibrator E. EPO concentrations above the concentration of the penultimate calibrator (in the example shown below as 156 mIU/mL) should be interpolated using the 405 nm reading.

9.2 Automated Method

Computer programs using cubic spline or 4 PL [4 Parameter Logistics] or Point-to-Point can generally give a good fit. For the 450 nm readings, construct a dose response curve (calibration curve) using the first five calibrators provided, i.e. Calibrators A, B, C, D and E. For the 405 nm readings, construct a second dose response curve using Calibrators A, D, E and F.

Construct a dose response curve (calibration curve) using Calibrators A, B, C, D and E.

Sample Data at 450 nm [raw A.U. readout against distilled or deionized water]

Microplate Well	1 st Reading Absorbance Unit	2 nd Reading Absorbance Unit	Average Absorbance Unit	EPO mIU/mL
Calibrator A	0.006	0.006	0.006	0
Calibrator B	0.094	0.092	0.093	10.3
Calibrator C	0.232	0.219	0.226	24.8
Calibrator D	0.509	0.474	0.492	48
Calibrator E	1.918	1.799	1.859	156
Control 1	0.171	0.170	0.171	18.2
Control 2	2.27	2.20	2.24	184
Patient Sample 1	0.012	-----	0.012	1.1
Patient Sample 2	0.031	-----	0.031	3.2
Patient Sample 3	0.089	-----	0.089	9.6
Patient Sample 4	0.508	-----	0.508	50.1
Patient Sample 5	3.283	-----	3.283	>156*

* Because the concentration of these samples are > than the concentration of Calibrator E, e.g. 156 mIU/mL, it is recommended to use the data obtained at 405 nm as shown in **Sample Data at 405 nm** in the table below.

Sample Data at 405 nm [raw A.U. readout against distilled or deionized water]

Microplate Well	1 st Reading Absorbance Unit	2 nd Reading Absorbance Unit	Average Absorbance Unit	EPO mIU/mL
Calibrator A	0	0	0	0
Calibrator D	0.14	0.13	0.135	48
Calibrator E	0.538	0.508	0.523	156
Calibrator F	2.06	2.03	2.04	523
Control 1	0.046	0.044	0.045	<156**
Control 2	0.649	0.626	0.638	184
Patient Sample 1	0.000	-----	0.000	<156**
Patient Sample 2	0.007	-----	0.007	<156**
Patient Sample 3	0.023	-----	0.023	<156**
Patient Sample 4	0.14	-----	0.14	<156**
Patient Sample 5	1.161	-----	1.161	302

For samples with concentrations < than the concentration of Calibrator E, e.g. 156 mIU/mL, it is recommended to use the data obtained at 450 nm as shown in **Sample Data at 450 nm** in the table above. This practice should give the results with optimum sensitivity of the assay.

NOTE: The data presented are for illustration purposes only and must not be used in place of data generated at the time of the assay.

10 QUALITY CONTROL

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results generated from the analysis of the control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. When the laboratory first introduces this EPO assay, the release of patient sample results should be based on whether the kit Control results fall within the suggested acceptable ranges. If one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the assay should be repeated. Once the laboratory has generated data of its own, the quality control parameters should be based on the statistical data by the laboratory, using either kit Control and/or serum pools made by the laboratory. Levy-Jenning plots on control results should be used. If the results for all the control samples are within mean + 2 standard deviations, with no definitive trend or bias of the quality control data, the assay should be deemed acceptable. The Westgard rule should be followed to be compliant with CLIA 88 regulations. If the control results do not fall within the stated parameters as described, assay results are invalid.

11 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Purified IgG proteins of the same species as the ones for which the capture and the label antibodies, were derived, in addition to one commercial heterophile antibody blocker, have been incorporated in the reagents to minimize the heterophile antibodies.[14] Nonetheless, there can be no assurance that the heterophile interference has been completely eliminated. Therefore, it is recommended that at least three dilutions of any elevated and/or suspect positive results be assayed to detect non-parallelism compared to reference standards.[15]

Because results obtained with one commercial EPO assay may differ significantly from those obtained with any other, it is recommended that any serial testing performed on the same patient over time should be performed with the same commercial EPO test.[16] This test may not be sufficiently sensitive to consistently discriminate abnormally low EPO values from normal levels of EPO.

Lower EPO levels than expected have been seen with anemias associated with the following conditions: rheumatoid arthritis, acquired immunodeficiency syndrome, cancer, and ulcerative colitis[17], sickle cell disease, and in premature neonates.[18] After allogeneic bone marrow transplant, impaired erythropoietin response may delay erythropoietin recovery.[17] Patients with hypergammaglobulinemia associated with multiple myeloma or Waldenstrom's disease have impaired production of erythropoietin in relation to hemoglobin concentration. This has been linked to increased plasma viscosity.[17] No drugs have been investigated for assay interference.

EPO levels of persons living at high altitudes with erythrocytosis may rapidly fall to normal after returning to low altitudes.[19]

Supplements containing high biotin levels such as those marketed for hair, skin, and nail benefits, may contain interfering biotin amounts. Biotin levels higher than the recommended daily allowance may cause interference with the assay. Therefore, it is important to communicate with health care providers and patients about biotin intake when collecting samples to prevent incorrect test results. Results show that the highest concentration at which no significant interference was observed is 1 ng/mL of D-Biotin.

The use of full or semi-automated equipment for dispensing of reagents and/or washing of the plate must be validated for equivalency to manual results by the laboratory.

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination, and other findings.

12 EXPECTED VALUES

EPO levels were measured in 120 apparently normal individuals in the U.S. with the DRG EPO ELISA. The samples consist of 61 males and 59 females, ranging from 18 to 96 years of age. There is no significant statistical difference on the reference ranges obtained from the female and male population of data. This finding, that there is no gender difference, is consistent with the literature [21]. Further, the EPO values do not appear to have significant age dependence, except higher values were obtained in samples from early phases of adulthood, i.e. approximately 22 to 42 years of age).

Using the nonparametric method for the analysis of reference values outlined in the NCCLS publication "How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory" (NCCLS Document C28-A, Vol. 15 No. 4) **the reference ranges (2.5 – 97.5 percentile) were 3.22 - 31.9 mIU/mL** for EPO in serum. Each laboratory should establish their own range of expected normal values.

"In patients with erythrocytosis due to uncompensated hypoxia, serum immunoreactive EPO is elevated; in those with compensated hypoxia, the serum immunoreactive EPO level is usually within the range of normal, and in patients with polycythemia vera, serum immunoreactive EPO is either normal or low. Thus, while an elevated serum EPO level suggests that erythrocytosis is a secondary phenomenon and a low EPO level supports the possibility of autonomous erythropoiesis, a normal serum EPO level excludes neither hypoxia nor autonomous EPO production as the cause of erythrocytosis." [20]

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1 Accuracy

Eighty-five (85) patient samples, with EPO values ranging from 3.8 to 304 mIU/mL, were assayed by the DRG ELISA procedure and an ELISA EPO kit. Linear regression analysis gives the following statistics:

$$\text{DRG ELISA} = 0.94 \text{ ELISA Kit} - 0.41 \text{ mIU/mL} \quad r = 0.989 \quad N = 85$$

13.2 Sensitivity

The sensitivity, or minimum detection limit, of this assay is defined as the smallest single value, which can be distinguished from zero at the 95% confidence limit.

The DRG EPO ELISA has a calculated sensitivity of 1.1 mIU/mL.

Hence, patient sample results below 1.1 mIU/mL should be reported as "Less than 1.1 mIU/mL."

13.3 Precision and Reproducibility

The Intra-assay precision of the DRG EPO ELISA Test was calculated from 22 replicate determinations on each of the two samples.

Intra-Assay Variation

Sample	Mean Value (mIU/mL)	N	Coefficient of Variation %
A	14.4	22	8.4
B	189	22	4.8

The inter-assay precision of the DRG EPO ELISA Test was calculated from data on two samples obtained in 22 different assays.

Inter-Assay Variation

Sample	Mean Value (mIU/mL)	N	Coefficient of Variation %
A	20.4	22	8.8
B	183	22	5.1

13.4 Specificity and Cross-Reactivity

Cross-reactivity in the EPO was studied by the addition of various substances to the Zero Calibrator (Calibrator A).

Cross reactant	Amount of Cross reactant Added
Human Transferrin	400 µg/mL
Human Bilirubin (unconjugated)	200 µg/mL
Human Hemoglobin	5 mg/mL
Human Alpha –Globulin	60 mg/mL
Human Alpha2-Macroglobulin	500 µg/mL
Human α 1-Acid Glycoprotein,	800 µg/mL
Human α 1-Antitrypsin	500 µg/mL
Triglycerides	30 mg/mL
Human Albumin	60 mg/mL
Human Gamma Globulin	60 mg/mL
ACTH (intact molecule: amino acid sequence1-39)	5,000 pg/mL
TSH	100 µIU/mL

None of the cross reactants interferes with this EPO ELISA in the concentrations studied. The very small changes in EPO seen for some cross reactants were well within the statistical limits of intra-assay variation.

13.5 Recovery

Various amounts of EPO were added to four different patient sera to determine the recovery. The results are described in the following table:

Serum Sample	Endogenous EPO (mIU/mL)	EPO added (mIU/mL)	Expected Value (mIU/mL)	Measured Value (mIU/mL)	Recovery (%)
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%

13.6 Linearity of Patient Sample Dilutions: Parallelism

Three patient serum samples were diluted with Calibrator A (Zero Calibrator). Results in mIU/mL are shown below:

Sample	Dilution	Expected	Observed	% Observed ÷ Expected
A	Undiluted	--	247.0	--
	1:2	123.5	119.0	96%
	1:4	61.8	58.5	95%
	1:8	30.9	28.8	93%
B	Undiluted	--	139.0	--
	1:2	69.5	74.0	106%
	1:4	34.8	39.9	114%
	1:8	17.4	19.8	114%
C	Undiluted	--	>500.0	--
	1:2	--	253.0	--
	1:4	126.5	116.0	92%
	1:8	63.3	57.0	90%

13.7 High Dose Hook Effect

The DRG EPO ELISA kit has exhibited no "high dose hook effect" in standard diluent spiked with 200,000 mIU/mL of EPO. Additionally, three samples with known high EPO values (1,920 mIU/mL, 1,520 mIU/mL, and 966 mIU/mL) were tested without dilution and their results read much greater than the highest standard. Samples with EPO levels greater than the highest calibrator, however, should be diluted and re-assayed for correct values.

1 VERWENDUNGSZWECK

Der EPO ELISA dient für die in-vitro-diagnostische Verwendung zur quantitativen Bestimmung von EPO (Erythropoietin) in Humanserum. Dieser Test dient dem Nachweis eines erhöhten oder zu niedrigen EPO-Spiegels in Humanserum, um im professionellen Einsatz die Diagnose von Anämien und Polyzythämien zu erleichtern.

2 ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

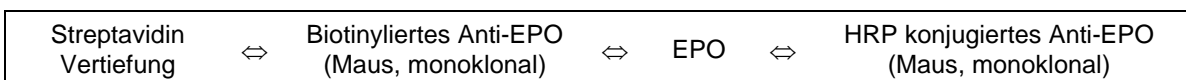
Erythropoietin (EPO) ist ein stark glykosiliertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 30 000 - 34 000 Dalton. Humanes EPO ist ein Polypeptid, das aus 165 Aminosäuren besteht und eine O-gebundene und drei N-gebundene Kohlenhydratketten enthält [1]. Rekombinantes EPO ist ein geeigneter Ersatz für das körpereigene Protein zur Verwendung im Immunoassay [2]. EPO- Serumspiegel sind abhängig von der Rate, mit der das Protein hergestellt und wieder eliminiert wird. 90 % des EPO werden in den peritubulären Zellen der erwachsenen Niere als Antwort auf eine Abnahme der Gewebsoxygenierung produziert [3,4]. Es gibt Hinweise darauf, dass das Protein auf diesen Zellen, welches den Grad der Sauerstoffsättigung des Bluts feststellt, eine Häm-Einheit enthält [5]. Während Sauerstoffpartialdruck (pO_2) des Plasmas und Hämatokritwerte sinken, steigt die EPO-Konzentration [6]. Eine normalerweise bestehende inverse Korrelation zwischen EPO- Serumspiegeln und Erythrozytenmasse ist ebenfalls beschrieben worden [7].

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

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

3 TESTPRINZIP

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



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

4 TESTKIT-KOMPONENTEN

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

4.1 WEITERE ERFORDERLICHE, NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE MATERIALIEN UND GERÄTE

- Mikrotiterplatten-Lesegerät zur Messung bei 450 nm und 405 nm.
- Mikrotiterplatten-Waschgerät [falls nicht verfügbar, ist das manuelle Waschen zulässig].
- Präzisionspipetten zur Pipettierung von 25, 200, 100 und 150 µL.
- (Optional): Mehrkanaldispenser bzw. Repetierpipette für 25, 100 und 150 µL.
- Zeitmesser, Genauigkeit ± 2 Minuten.
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
- Orbitalrotator oder Shaker.
- Mikrotiterplattenschüttler: DRG hat die folgenden Drehzahleinstellungen für die einzelnen Schütteldurchmesser ermittelt, bei denen die Streptavidin-Kits ihre optimale Leistungsreaktion behalten:

Mikrotiterplattenschüttler	Schütteldurchmesser	Drehzahleinstellung
Orbital	3 mm (0,1118 in)	600 ± 10 rpm
	19 mm (0,75 in)	170 ± 10 rpm
Linear	25 mm (0,98 in)	170 ± 10 rpm

5 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Sicherheitsdatenblätter (SDS) sind auf Anfrage erhältlich.

VORSICHT POTENZIELLE BIOGEFAHR

Alle Reagenzien dieses Testkits sind spezifisch so beschaffen, dass sie keine humanen Blutkomponenten enthalten. In den humanen Patientenproben kann das Vorhandensein von HBsAg, HBcAg bzw. HIV-Antikörpern jedoch nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potenziell infektiöses Material behandelt werden. Die bei ungetesteten Patientenproben üblichen Vorsichtsmaßnahmen gelten auch für den Umgang mit diesem Material.

VORSICHT

Dieses Produkt enthält Material tierischen Ursprungs und sollte als potenzieller Träger und Überträger von Krankheiten behandelt werden.

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

ELISA Reagenz 1

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

ELISA Reagenz A, Waschkonzentrat, und EPO-Kalibratoren und Kontrollen

enthalten alle Ciprofloxacinhydrochlorid als Konservierungsmittel. Von Personal fernhalten, das eine Sensitivität gegenüber Quinolin-basierten Mitteln aufweist. Schwangere Frauen bzw. Frauen mit Verdacht auf eine Schwangerschaft sollten jeglichen Umgang mit Ciprofloxacin vermeiden.

Wenn eine Trübung in einem Reagenz beobachtet wird, führen Sie keinen Assay durch und kontaktieren Sie Ihren Lieferanten. Im Handel sind verschiedene Schüttlertypen mit unterschiedlichen technischen Daten erhältlich. Falls der im Labor eingesetzte Mikrotiterplattenschüttler andere als die oben angegebenen Daten aufweist, sollten Sie selbst die optimale Einstellung ermitteln.

6 PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

Die Bestimmung von EPO ist mit Humanserum durchzuführen. Um die Proben in Doppelbestimmung zu testen, sind 400 µL Humanserum erforderlich. Es wird empfohlen, die Proben zwischen 7.30 und 12.00 Uhr mittags zu entnehmen, da in der Literatur ein zirkadianer Rhythmus für das Erythropoietin beschrieben wird [11,12].

Vollblut in einem Reagenzglas ohne Antikoagulanzen sammeln. Blut, wenn möglich, bei einer Temperatur von 2 °C - 8 °C gerinnen lassen. In Serumproben, die bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) geronnen, wurde ein Absinken der im Radioimmunoassay ermittelten EPO-Werte um ca. 30 % gegenüber einer Gerinnung bei starker Kühlung beschrieben [13].

Das Serum ist anschließend, vorzugsweise in einer Kühlzentrifuge, sofort zu trennen und bei -15 °C oder darunter zu lagern. Serumproben können bei 2 °C - 8 °C bis zu 24 Stunden gelagert werden. Auf -15 °C tiefgefrorene Serumproben sind bis zu 12 Monate stabil. Proben in einem Gefrierschrank ohne automatische Abtauung lagern. Wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren der Proben ist zu vermeiden.

Für eine Langzeitlagerung der Proben wird empfohlen, diese vor dem Einfrieren in Reagenzröhrchen oder Flaschen zu aliquotieren. Vor der Verwendung alle Proben auf Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) bringen. Durch vorsichtiges Überkopfdrehen oder Schwenken mischen. Extrem hämolytische oder lipämische Proben sind zu vermeiden.

7 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

Alle Testkit-Komponenten bei 2-8 °C lagern.

1. Alle Reagenzien mit Ausnahme der Kalibratoren, Testkit-Kontrollen und dem Waschkonzentrat sind gebrauchsfertig. Alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C lagern.
2. Den **Nullkalibrator** (Kalibrator A) mit 4 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren und mischen. Jeden der **nicht-Nullkalibratoren** (Kalibrator B bis F) und die **Testkit-Kontrollen** 1 und 2 mit 2 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren und mischen.

Flaschen 10 Minuten ruhen lassen. Anschließend durch vorsichtiges Überkopfdrehen gründlich mischen, um eine vollständige Rekonstitution sicherzustellen. **Kalibratoren und Kontrollen sind nach Rekonstitution sobald wie möglich zu verwenden. Übrigbleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-15 °C).** Standards und Kontrollen sind 6 Wochen nach Rekonstitution bei -15 °C stabil und können maximal dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, wenn die im Abschnitt „Verfahrenstechnische Hinweise“ gegebenen Empfehlungen beachtet werden.

3. **ELISA Reagenz A: Waschkonzentrat:**

Inhalt gründlich mischen. Ist eine Niederschlagsbildung im Waschkonzentrat auf Grund einer Lagerung bei niedrigen Temperaturen wie 4 °C eingetreten, ist das Präzipitat durch Platzen des Gefäßes in ein Wasserbad oder einen Laborofen bei 37 °C und zusätzliches Schwenken und Rühren aufzulösen. Waschkonzentrat (30 mL) zu 570 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser hinzufügen und mischen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Raumtemperatur 90 Tage stabil.

8 TESTVERFAHREN

1. Eine für alle sechs (6) Kalibratoren, A – F der EPO-KALIBRATOREN [genaue Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten vermerkt], Kontrollen und Patientenproben ausreichende Anzahl Streptavidin-beschichteter Streifen in die Halterung einsetzen. Bestimmen Sie mindestens zwei Vertiefungen, die als "Blindproben" dienen. Siehe Schritt 9 dieses Abschnitts.
2. **200 µL** der Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die dafür vorgesehenen oder gekennzeichneten Vertiefungen pipettieren. **Übrigbleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-15 °C).**
3. **25 µL** des Reagenz 1 (biotinylierter Antikörper) in jede der Vertiefungen, die bereits die Kalibratoren, Kontrollen und Proben enthalten, pipettieren bzw. dispensieren.
4. **25 µL** des Reagenz 2 (enzymgekoppelter Antikörper) in dieselben Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Mikrotiterplatte kräftig gegen einen festen Gegenstand, z. B. einen Stift, klopfen, um eine gründliche Vermischung der Proben und Reagenzien zu erreichen. Um eine vollständige Vermischung sicherzustellen, verbleibende drei der vier Seiten der Mikrotiterplatte ebenfalls mindestens jeweils 5-mal gegen das Objekt klopfen. Verschütten des Gemischs vermeiden. Mikrotiterplatte(n) mit Aluminiumfolie oder einem Deckel abdecken, um Licht fernzuhalten. Platte **2 Stunden ± 15 Minuten bei Raumtemperatur** (22 °C – 28 °C) auf einem Schüttler inkubieren, wobei der Schüttler auf die empfohlenen Werte eingestellt ist (siehe Abschnitt IV).
5. Flüssigkeit zunächst vollständig absaugen. Anschließend jede der Vertiefungen **fünf (5) Mal** mit dem verdünnten Waschpuffer (mit Reagenz A erstellt) in einem automatischen Waschgerät waschen/absaugen. Die Waschpuffer-Dispensionsmenge ist auf **0,35 mL** je Vertiefung einzustellen.
6. **150 µL** des ELISA Reagenz B (TMB-Substratlösung) in jede der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren, außer in den Blindproben. Wie in Schritt (4) beschrieben auf die Mikrotiterplatte klopfen.
7. Mikrotiterplatte(n) mit einer entsprechenden Abdeckung zur Vermeidung von Lichteinstrahlung (siehe Abschnitt IV) **30 ± 5 Minuten bei Raumtemperatur** (22 °C – 28 °C) auf einem **Schüttler** inkubieren, wobei der Schüttler auf die empfohlenen Einstellungen gesetzt sein muss.
8. **100 µL** der Stopplösung in jede der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren, außer in den Blindproben. Wie in Schritt (4) beschrieben auf die Mikrotiterplatte klopfen. Verschütten des Gemischs vermeiden. Die Unterseite der Vertiefungen mit einem fusselfreien Lappen abwischen.
9. Vor der Messung sicherstellen, dass beide Blindproben gemäß Schritt 1 mit 250 µL destilliertem oder deionisiertem Wasser gefüllt sind. Das Plattenlesegerät gemäß den Anweisungen des Herstellers durch Verwendung der leeren Vertiefungen nullen.* Die Absorption der Lösung in den Vertiefungen innerhalb von 10 Minuten mit einem auf **450 nm** eingestellten Mikroplattenlesegerät ablesen. **Anschließend noch einmal** bei einer Wellenlänge von **405 nm** gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser messen.

* Wenn das ELISA-Mikrotiterplatten-Lesegerät nicht mit Blindproben auf null eingestellt werden kann, subtrahieren Sie den Blindproben-Absorptionswert von allen anderen Absorptionswerten, um die Ergebnisse zu erhalten.

Hinweis: Die zweite Messung erfolgt, um die analytische Gültigkeit der Kalibrationskurve auf den höchsten Kalibratorwert (ca. 450 mIU/mL) auszudehnen. (Die genaue Konzentration ist auf den Flaschenetiketten vermerkt und variiert von Charge zu Charge leicht.) Somit können Patientenproben mit EPO-Werten > als der vorletzte [zweithöchste] Kalibrator, d.h. Kalibrator E, gegen eine Kalibrationskurve aus Messwerten bis zu der Konzentration, die dem höchsten Kalibrator entspricht, quantifiziert werden. Gemessen wird bei 405 nm, in sicherem Abstand von der Wellenlänge der maximalen Absorption. Patienten- und Kontrollproben sind bei EPO- Konzentrationen bis zur Konzentration von Kalibrator E bei 450 nm zu messen. EPO- Konzentrationen oberhalb von Kalibrator E werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.

10. Unter Verwendung der im vorherigen Schritt ermittelten endgültigen Absorptionswerte können zwei Kalibrationskurven (eine bei 405 nm, die zweite bei 450 nm) mittels kubischer Splines, 4-Parameter Logistik oder Punkt-zu-Punkt-Interpolation zur Quantifizierung der EPO- Konzentration erstellt werden.

8.1 VERFAHRENSTECHNISCHE HINWEISE

- Proben mit Werten unterhalb der Nachweisgrenze (1,1 mIU/mL) sind als „< 1,1 mIU/mL“ im Bericht zu führen.
- Es wird empfohlen, alle Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmung zu testen, bis der Labortechniker darin ausreichend Erfahrung gesammelt hat. Diese wird durch einen in Doppelbestimmung ermittelten Variationskoeffizienten unter 10 % [mit Ausnahme der Werte unterhalb des zweitniedrigsten Nicht-Nullstandards] und die Fähigkeit, Ergebnisse für die Kontrollen innerhalb des vorgegebenen Akzeptanzbereichs zu erzielen, belegt.
- Die Proben sollten bei minimaler Luftbildung in die Vertiefungen pipettiert werden.

- Patientenproben mit einer höheren Konzentration als der höchsten Kalibratorkonzentration (Kalibrator F) von ca. 450 mIU/mL (genaue Konzentrationsangaben auf dem Flaschenetikett, da Abweichungen von Charge zu Charge vorkommen) sind mit Kalibrator A (Nullkalibrator) zu verdünnen und erneut zu testen. Das Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren. Das Ergebnis kann auch als höher als die höchste Kalibratorkonzentration (Kalibrator F) angegeben werden. Hat Kalibrator F beispielsweise einen zugewiesenen EPO- Wert von 494 mIU/mL, ist im Bericht der Wert „> 494 mIU/mL“ zu führen.
- Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht gemischt werden.
- Alternativ können für den Test ausreichende Mengen Reagenz 1 (biotinylierter Antikörper) und Reagenz 2 (enzymgekoppelter Antikörper) zu gleichen Teilen in einer sauberen brauntransparenten Flasche gemischt werden. Bei Lagerung bei 4 °C ist das Mischreagenz sieben (7) Tage stabil. Anschließend 50 µL des Gemischs in jede Vertiefung pipettieren. Diese Methode ersetzt Schritt (3) und (4) und ist von der Inkubation gefolgt.
- Beim Mischen ist ein Verschütten der Reagenzien aus den Vertiefungen zu vermeiden. Sorgfältiges Arbeiten ist für die Präzision des Tests und die Zuverlässigkeit der Ergebnisse von großer Bedeutung.

9 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

9.1 Manuell

1. Erstellen einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Kalibrationskurve) für die Messung bei 450 nm unter Verwendung der ersten fünf im Testkit enthaltenen Kalibratoren, d. h. Kalibrator A, B, C, D und E. Erstellen einer zweiten Dosis-Wirkungs-Kurve für die Messung bei 405 nm unter Verwendung der Kalibratoren A, D, E und F.

Konstruieren Sie eine Dosis-Wirkungs-Kurve (Kalibrationskurve) mit Kalibratoren A, B, C, D und E.

2. Daten der Kalibrationskurve auf Millimeterpapier übertragen, wobei die Konzentration auf der X-Achse gegen die entsprechende Absorptionseinheit auf der Y-Achse aufzutragen ist.
3. Zwei nebeneinander liegende Punkte sind durch eine Gerade zu verbinden. Dieser mathematische Algorithmus wird als lineare Interpolation bezeichnet. Die Probenkonzentration ist durch Feststellung der Absorptionseinheit auf der Y-Achse und des zugehörigen Konzentrationswerts auf der X-Achse zu ermitteln. Patienten- und Kontrollproben sind bei EPO-Konzentrationen bis zum zweitletzten [zweithöchsten] Kalibrator, Kalibrator E, bei 450 nm zu messen. EPO-Konzentrationen oberhalb der Konzentration des zweitletzten Kalibrators (im Beispiel unten mit 156 mIU/mL angegeben) werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.

9.2 Automatisch

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

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

Mikrotiterplatten - Vertiefung	1. Messwert Absorptionseinheit	2. Messwert Absorptionseinheit	Mittlere Absorptionseinheit	EPO mIU/mL
Kalibrator A	0,006	0,006	0,006	0
Kalibrator B	0,094	0,092	0,093	10,3
Kalibrator C	0,232	0,219	0,226	24,8
Kalibrator D	0,509	0,474	0,492	48
Kalibrator E	1,918	1,799	1,859	156
Kontrolle 1	0,171	0,170	0,171	18,2
Kontrolle 2	2,270	2,200	2,240	184
Patientenprobe 1	0,012	-----	0,012	1,1
Patientenprobe 2	0,031	-----	0,031	3,2
Patientenprobe 3	0,089	-----	0,089	9,6
Patientenprobe 4	0,508	-----	0,508	50,1
Patientenprobe 5	3,283	-----	3,283	>156*

* Da die gemessene Konzentration > die Konzentration von Kalibrator E ist (hier: 156 mIU/mL), sollten die bei 405 nm ermittelten Werte angegeben werden, die nachfolgend unter **Beispieldaten** bei 405 nm aufgeführt sind.

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

Mikrotiterplatten - Vertiefung	1. Messwert Absorptionseinheit	2. Messwert Absorptionseinheit	Mittlere Absorptionseinheit	EPO mIU/mL
Kalibrator A	0	0	0	0
Kalibrator D	0,140	0,130	0,135	48
Kalibrator E	0,538	0,508	0,523	156
Kalibrator F	2,060	2,030	2,040	523
Kontrolle 1	0,046	0,044	0,045	<156**
Kontrolle 2	0,649	0,626	0,638	184
Patientenprobe 1	0,000	-----	0,000	<156**
Patientenprobe 2	0,007	-----	0,007	<156**
Patientenprobe 3	0,023	-----	0,023	<156**
Patientenprobe 4	0,140	-----	0,140	<156**
Patientenprobe 5	1,161	-----	1,161	302

** Da die gemessene Konzentration < die Konzentration von Kalibrator E ist (hier: 156 mIU/ml), sollten die bei 450 nm ermittelten Werte angegeben werden, die nachfolgend unter **Beispieldaten** bei 450 nm aufgeführt sind. Durch diese Vorgehensweise wird die bestmögliche Sensitivität erreicht.

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

10 QUALITÄTSKONTROLLE

Kontrollproben oder Serumpools sind in jedem Testlauf mit Kalibratoren und Patientenproben mitzuführen. Aus der Analyse der Kontrollproben gewonnene Ergebnisse sind mithilfe der entsprechenden statistischen Methoden auf ihre Akzeptanz auszuwerten. Führt ein Labor diesen EPO-Assay neu ein, ist die Veröffentlichung von Ergebnissen aus Patientenproben davon abhängig zu machen, ob die Ergebnisse der Testkit-Kontrollen innerhalb des vorgegebenen Akzeptanzbereichs liegen. Liegen einer oder mehrere der Probenwerte für die Qualitätskontrolle außerhalb des Akzeptanzbereichs, ist der Test zu wiederholen. Hat das Labor dann selbst Daten ermittelt, sind die Qualitätskontrollparameter auf die statistischen Daten des Labors zu basieren, wobei Testkit-Kontrollen und/oder durch das Labor erstellte Serumpools zu verwenden sind.

Kontrollergebnisse sind im Levy-Jennings-Plot darzustellen. Wenn die Ergebnisse aller Kontrollproben im Bereich des Mittelwerts + 2 Standardabweichungen ohne definitiven Trend oder Tendenz der Qualitätskontrolldaten liegen, sind die Testergebnisse als gültig anzusehen. Die Westgard-Regeln sind zur Einhaltung der CLIA'88-Vorschriften zu befolgen. Wenn die Kontrollergebnisse nicht wie beschrieben innerhalb der genannten Parameter liegen, sind die Testergebnisse ungültig.

11 GRENZEN DES VERFAHRENS

Gereinigte IgG-Proteine derselben Spezies, für die die Fangantikörper und markierten Antikörper gewonnen wurden, wurden zusätzlich zu einem kommerziellen blockierenden heterophilen Antikörper in die Reagenzien gegeben, um die Anzahl heterophiler Antikörper zu minimieren [14]. Es gibt jedoch keine Gewährleistung dafür, dass die Interferenzen durch heterophile Antikörper vollständig beseitigt wurden. Es wird daher empfohlen, wenigstens drei Verdünnungen aller erhöhten und/oder möglicherweise positiven Ergebnisse zu testen, um Unparallelitäten im Vergleich zu den Referenzstandards festzustellen [15].

Da die mit einem kommerziellen EPO-Assay ermittelten Ergebnisse erheblich von solchen in anderen Tests ermittelten abweichen können, wird empfohlen, seriell Testen desselben Patienten über einen längeren Zeitraum mit demselben kommerziellen EPO-Test durchzuführen [16]. Dieser Test weist möglicherweise nicht die ausreichende Empfindlichkeit auf, um gleichbleibend ungewöhnlich niedrige EPO-Konzentrationen von normalen EPO-Werten zu unterscheiden.

Niedrigere EPO-Werte als erwartet wurden bei Anämien in Zusammenhang mit den folgenden Erkrankungen beobachtet: rheumatoide Arthritis, AIDS, Krebs, Colitis ulcerosa [17], Sichelzellanämie und bei Frühgeborenen [18].

Nach einer allogenen Knochenmarkstransplantation kann durch eine beeinträchtigte Erythropoietin-Antwort die Zunahme an Erythropoietin verzögert werden [17]. Patienten mit Hypergammaglobulinämie in Verbindung mit multiplen Myelomen oder der Waldenström-Krankheit zeigen eine gestörte Erythropoietin-Synthese in Relation zur Hämoglobin-Konzentration. Dies wird auf eine erhöhte Plasmaviskosität zurückgeführt [17]. Medikamente wurden nicht auf ihre Assay-Interferenz überprüft.

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

Nahrungsergänzungsmittel mit einem hohen Biotingehalt, die beispielsweise für die Pflege von Haaren, Haut und Nägeln erhältlich sind, können störende Biotinmengen enthalten. Biotinspiegel, die über der empfohlenen Tagesdosis liegen, können zu Störungen des Assays führen. Daher müssen bei der Aufnahme von Proben Gesundheitsdienstleister und Patienten hinsichtlich der Einnahme von Biotin befragt werden, um falsche Untersuchungsergebnisse zu vermeiden. Die Ergebnisse zeigen, dass die höchste Konzentration, bei der keine signifikante Interferenz beobachtet wurde, bei 1 ng/mL D-Biotin liegt.

Die Verwendung voll- oder halbautomatischer Geräte zur Reagenzienabgabe und/oder zum Waschen der Platte muss vom Labor in Bezug auf die Gleichwertigkeit mit manuell erzielten Ergebnissen validiert werden.

Zu diagnostischen Zwecken sollten die Ergebnisse immer in Verbindung mit der Krankengeschichte, der klinischen Untersuchung und sonstigen Befunden des Patienten beurteilt werden.

12 ERWARTETE WERTE

Mithilfe des DRG EPO ELISA wurden in den USA bei hundertzwanzig (120) scheinbar gesunden Probanden EPO-Konzentrationen gemessen. Die Proben wurden 61 männlichen und 59 weiblichen Probanden im Alter von 18 bis 96 Jahren entnommen. Es bestehen keine signifikanten statistischen Unterschiede zwischen den für die weiblichen und männlichen Probanden ermittelten Referenzbereichen. In der Literatur wird dieses Ergebnis (die Geschlechtergleichheit bezüglich EPO-Werten) bestätigt [21]. Darüber hinaus zeigen die EPO-Werte keine signifikante Altersabhängigkeit, mit Ausnahme erhöhter Probenwerte bei Personen im frühen Erwachsenenalter (ungefähr zwischen 22 und 42 Jahren). Die in der NCCLS-Veröffentlichung beschriebene non-parametrische Methode zur Analyse der Referenzwerte („How to Define, Determine, and Utilize Reference Intervals in the Clinical Laboratory“ (NCCLS Document C28-A, Vol. 15 No. 4) ergab einen Referenzbereich von **3,22 – 31,9 mIU/mL (2,5 – 97,5 Percentile)** für EPO im Serum.

Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalwertbereich erstellen.

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

13 LEISTUNGSMERKMALE

13.1 Genauigkeit

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

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

13.2 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit bzw. untere Nachweisgrenze dieses Tests ist als der kleinste Wert definiert, der auf Basis des 95 %-Vertrauensbereichs vom Nullstandard unterschieden werden kann.

Der DRG EPO ELISA hat eine berechnete Empfindlichkeit von 1,1 mIU/mL.

Daher sind Ergebnisse aus Patientenproben unter 1,1 mIU/mL als „< 1,1 mIU/mL“ im Bericht zu führen.

13.3 Präzision und Reproduzierbarkeit

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

Intra-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert (mIU/mL)	N	Variationskoeffizient %
A	14,4	22	8,4
B	189	22	4,8

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

Inter-Assay Abweichung

Probe	Mittelwert (mIU/mL)	N	Variationskoeffizient %
A	20,4	22	8,8
B	183	22	5,1

13.4 Spezifität und Kreuzreaktivität

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

Kreuzreaktant	Menge des hinzugefügten Kreuzreaktanten
Humanes Transferrin	400 µg/mL
Humanes Bilirubin (unkonjugiert)	200 µg/mL
Humanes Hämoglobin	5 mg/mL
Humanes Alpha-Globulin	60 mg/mL
Humanes Alpha-2-Makroglobulin	500 µg/mL
Humanes Alpha-1-Säure Glykoprotein	800 µg/mL
Humanes Alpha-1-Antitrypsin	500 µg/mL
Triglyceride	30 mg/mL
Humanes Albumin	60 mg/mL
Humanes Gammaglobulin	60 mg/mL
ACTH (intaktes Molekül: Aminosäuresequenz 1-39)	5 000 pg/mL
TSH	100 µIU/mL

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

13.5 Wiederfindung

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

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

13.6 Linearität von Patientenprobenverdünnungen: Parallelität

Drei Patientenserumproben wurden mit Kalibrator A (Nullkalibrator) verdünnt. Ergebnisse (in mIU/mL), wie unten gezeigt:

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













13.7 High Dose Hook Effect

Der DRG EPO ELISA zeigt keinen „High Dose Hook-Effekt“ in Standardverdünner, der mit 200.000 mIU/mL EPO versetzt ist. Zusätzlich wurden drei Proben mit bekannten hohen EPO- Werten (1,920 mIU/mL, 1,520 mIU/mL und 966 mIU/mL) ohne Verdünnung getestet. Die abgelesenen Ergebnisse lagen weit über dem höchsten Standard. Proben mit höheren EPO-Spiegeln als die des höchsten Kalibrators sind jedoch zu verdünnen und erneut auf korrekte Werte zu testen.

14 REFERENCES / LITERATURE

1. Sawyer, S.T., Krantz, S.B., Sawada, K. *Receptors for Erythropoietin in Mouse and Human Erythroid Cells and Placenta.* **Blood** 1989; 74: 103-109.
2. 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.
3. Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Fried, W., Pizak, L.F. *The Role of the Kidney in Erythropoiesis.* **Nature** 1957; 179: 633-634.
4. 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.
5. 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.
6. Erslev, A.J., Caro, J., Birgegard, G., Silver, R., Miller, O. *The Biogenesis of Erythropoietin.* **Experimental Hematology** 1980; Suppl 8: 1-13.
7. Spivak, J.L. *The Mechanism of Action of Erythropoietin.* **Int J Cell Cloning** 1986; 4: 139-166.
8. Erslev, A.J. *Erythropoietin.* **New Eng J Med** 1991; 324:1339-1344.
9. 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.
10. Wild, D., editor. **The Immunoassay Handbook**, Stockton Press, 1994, p. 428.
11. Wide L., Bengtsson C., Birgegard G. *Circadian Rhythm of Erythropoietin in Human Serum.* **Br J Haematol** 1989; 72: 85-90.
12. 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.
13. Goldwasser E. and Sherwood J.B. *Annotation, Radioimmunoassay of Erythropoietin.* **Br J Haematol** 1981; 48: 359-63.
14. Kricka L.J. *Human Anti-Animal Antibody Interferences in Immunological Assays.* **Clin Chem** 1999; 45: 942-956.
15. 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.
16. Jelkmann W. *Renal Erythropoietin: Properties and Production.* **Rev Physiol Biochem Pharmacol** 1986; 104: 139-215.
17. Cotes M.P. *Anomalies in Circulating Erythropoietin Levels.* **Annals of NY Acad, Sci** 1994; 718:103-9.
18. **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.
19. Fairbanks V. Q & A. **CAP Today** Nov 1996, pg. 88.
20. 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
21. 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.

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité