

Bornmann-Hollstein, A.:

Enzymimmunologischer Nachweis von Erythropoietin im Blut von Hund, Katze und Pferd

Erythropoietin (EPO) ist ein wesentliches Regulatorhormon der Erythropoese. Bei adulten Menschen und Tieren wird es hauptsächlich in der Niere, zu einem geringeren Teil aber auch in der Leber synthetisiert. Gewebshypoxie induziert seine Produktion und Ausschüttung. Über das Blutgefäßsystem gelangt es zum Knochenmark, um hier die Proliferation und Differenzierung roter Blutzellen aus deren Vorläuferzellen zu bewirken.

In der Humanmedizin dient die Erythropoietinbestimmung zur Differenzierung von Anämien und Polycythämien, sowie zur Diagnose eines relativen oder absoluten EPO-Mangels. Dieser gilt als Indikation zur Substitutionstherapie mit rekombinantem humanem EPO.

In der Veterinärmedizin liegen bisher nur vereinzelte Untersuchungen mit verschiedenen, teils sehr aufwendigen Bestimmungsmethoden und deren diagnostischen Nutzen bei an Anämien und Polycythämien unterschiedlicher Genese erkrankten Tieren vor.

Ein empfindlicher und zuverlässiger quantitativer EPO-Nachweis stellt jedoch die unerlässliche Grundlage zur verantwortlichen Indikation und Überprüfung einer Substitutionstherapie mit exogen zugeführtem Erythropoietin beim Tier dar.

In dieser Arbeit wurde ein ELISA-Verfahren auf seine **Spezifität, Empfindlichkeit und Anwendbarkeit** zur Erythropoietinbestimmung bei Hund, Katze und Pferd überprüft.

Die Spezifitätsprüfung erfolgte durch

- die Herstellung von Titrationsgeraden von Serum- und Plasmaproben ,
- die biochemische Überprüfung der monoklonalen Antikörper mittels Immunoblot-Technik auf ihre Bindung an Erythropoietin und mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Probenbestandteilen und
- die Messung von Erythropoietinverlaufskurven bei Tieren, die einen definierten Blutverlust erfahren hatten.

Titrationseraden von Serum- und Plasmaproben der drei Tierarten verliefen bei 69,2 % parallel zur Erythropoietinstandard- und Kontrollgeraden, bei 25,3 % war diese Parallelität nicht gegeben. In 5,5 % der Fälle war EPO auf Grund zu geringer Probengehalte nicht nachzuweisen.

Mittels Immunoblot-Technik konnte gezeigt werden, daß der monoklonale Fänger- und Nachweisantikörper des eingesetzten ELISA-Testsystems rekombinantes humanes Erythropoietin spezifisch nachweisen. Der Fängerantikörper zeigt außerdem eine unspezifische Bindung an einen Probenbestandteil im Plasma des Menschen und im Serum des Hundes im Molekulargewichtsbereich von 55 KD. Erkenntnisse über Molekulargewichte kreuzreagierender Probenbestandteile im untersuchten ELISA-Verfahren im Falle der unspezifischen Titrationsen konnten mittels dieser Technik nicht gewonnen werden.

Bei je zwei Hunden, Katzen und Pferden, die einen definierten Blutentzug erfahren hatten, konnte eine EPO-Verlaufskurve mit Anstieg, Maximum und Abfall des Gewebshormons nachgewiesen werden. Das Erythropoietinmaximum wurde nach 1-4 Tagen erreicht.

Die **Empfindlichkeit** des Erythropoietinnachweises wurde durch die Bestimmung der Intra- und der Interassayvarianz und der unteren Nachweisgrenze geprüft.

Bei der Intrassayvarianz mit drei unterschiedlichen Proben und je 6 Bestimmungen ergaben sich Variationskoeffizienten von 4,0 % (hoher EPO-Gehalt der Probe) - 12,3 % (niedriger EPO-Gehalt der Probe).

Die Variationskoeffizienten der Interassayvarianz betragen bei 3 adäquaten Testdurchführungen an verschiedenen Untersuchungstagen 13,5 - 17,0 % (Anzahl der Proben: n = 3).

Die untere Nachweisgrenze lag bei 1 U/l Erythropoietin.

Auf Grund der Ergebnisse, die sich aus der Titration der Plasma- und Serumproben, der Spezifitätsprüfung des monoklonalen Fänger- und Nachweisantikörpers mittels Immunoblot-Technik, der Provokation der Erythropoietinausschüttung (EPO-Verlaufskurven) und der Inter- und Intraassayvarianzen ergaben, kann von einem empfindlichen, spezifischen und zuverlässigen Erythropoietinnachweis bei Hund, Katze und Pferd durch das untersuchte ELISA-Verfahren ausgegangen werden, wenn die Erythropoietinbestimmung in mindestens 4 geeigneten Verdünnungsstufen erfolgt und die Probengerade parallel zur Standardgerade verläuft.

Auf dieser Grundlage aufbauend wurden erstmals **vorläufige EPO-Äquivalenznormalwertbereiche** (äquivalent zum Humanstandard, der im untersuchten

Testsystem eingesetzt wurde) von 0-6 U/l EPO beim Hund und 0-20 U/l EPO bei Katze und Pferd festgelegt.

Zur Prüfung der **Anwendbarkeit** des ELISA-Nachweissystems wurde der Erythropoietingehalt von Serum- und Plasmaproben von Hunden (n=31) und Katzen (n=6) bestimmt, die unter Anämien und Polycythämien unterschiedlicher Genese litten.

Es wurde eine inverse Korrelation zwischen EPO-Spiegel und Hämatokritwert festgestellt ($r = -0,7$).

Besonders hohe Erythropoietinmesswerte ergaben sich bei Tieren, die unter aplastischer Anämie litten. In diesen Fällen war der EPO-Spiegel zum Teil 1000-fach über die vorläufig festgelegte obere Normgrenze erhöht. Relativ oder absolut zu niedrige EPO-Werte wurden bei Patienten beobachtet, die unter renaler Anämie litten. Hier untersuchte Tiere, bei denen die Verdachtsdiagnose Polycythämia vera oder sekundäre Polycythämie gestellt worden war, wiesen normale bis sehr niedrige Erythropoietinspiegel auf.

Die Ergebnisse dieser ersten Messungen von Patientenproben geben deutliche Hinweise darauf, daß mit Hilfe des untersuchten ELISA-Verfahrens erweiterte diagnostische und prognostische Aussagen bei Hunden und Katzen möglich sind, die unter Anämien und Polycythämien verschiedenster Genese leiden. Aus den nun empfindlich quantifizierbaren EPO-Gehalten in Körperflüssigkeiten ergeben sich dann Indikationen zur Substitution und Dosierung von exogen zugeführtem EPO, sobald entsprechende sorgfältige klinische Studien die Bedeutung der in Serum und Plasma messbaren EPO-Spiegel und der EPO-Substitution hinreichend geklärt haben.

Bornmann-Hollstein, A.:

Enzyme-immunological quantitation of Erythropoietin in blood of dogs, cats and horses

Erythropoietin (EPO) is an essential regulatory hormone of erythropoiesis. In adult human beings and animals it is synthesised mainly in the kidney and, to a lesser extent, in the liver. Release and production is induced by tissue hypoxia. EPO reaches the bone marrow via blood circulation and induces the proliferation and differentiation of erythroid progenitor cells.

In human medicine, determination of EPO levels is necessary for more detailed diagnosis of anaemias and polycythaemias as well as for the diagnosis of relative or absolute EPO deficiency which is an indication for therapeutic substitution of recombinant human EPO.

In veterinary medicine only very few investigations with different and partially very laborious determination methods were performed and tested for their diagnostic value in animals with anaemias and polycythaemias of different ethiology.

A sensitive, quantitative and reliable determination of EPO would be the indispensable basis for responsible indication and monitoring of a substitution therapy with exogenously supplied Erythropoietin.

In this work an ELISA system was tested for **specificity, sensitivity and applicability** for the Erythropoietin determination in dogs, cats and horses.

The **specificity** was tested by

- generation of titration curves of serum and plasma samples,
- demonstrating the reactivity of the monoclonal antibodies in an immunoblot assay with Erythropoietin and possible crossreactions with other molecules the serum or plasma
- kinetic studies of Erythropoietin levels in animals which had received a defined blood loss

Titration curves of sera and plasma samples of the three animal species ran parallel to the Erythropoietin standard and control curves in 69.2% of the cases. In 25.3% no parallelity was observed. Probably due to very low contents in the samples, EPO could not be determined in 5.5% of the cases.

On immunoblots it was shown that the catching monoclonal antibody and the detecting antibody included in the tested ELISA system do bind human recombinant Erythropoietin. The catching antibody crossreacted additionally with molecules showing a molecular weight of 55 KD. No reliable information about crossreacting molecules in the tested ELISA system in the case of titration curves, which ran not parallel to the standard and control curves were obtained with this technique.

In two dogs, cats and horses which received a defined blood loss an EPO kinetic curve with rise, maximum and decline of the tissue hormone was demonstrated. The maximum was reached after 1-4 days, depending on the individual animal.

The sensitivity of Erythropoietin measurement was tested by determination of the intra- and inter assay coefficient of variance and the lower detection limit of the assay system.

The intra assay coefficient of variance with three different samples and 6 repetitive measurements each was between 4.0% (high EPO content of the samples) and 12.3% (low EPO content of the samples).

The inter assay coefficient of variance (3 tests on different days) was 13.5 - 17.0%.

The lower detection limit was 1 U/l Erythropoietin.

Based on the results described above (titration curves, specificity of catching and detecting monoclonal antibodies, provocation of Erythropoietin release and intra- / inter assay coefficients of variance) it can be concluded that the ELISA system is able to detect Erythropoietin in dogs, cats and horses very reliable if four proper dilutions of the samples are used and if the resulting curve runs parallel to the standard curve.

On this basis, for the first time, preliminary EPO normal value regions (equivalent to the human standard used in the tested system) were set for dogs (0-6 U/l EPO), cats and horses (0-20 U/l EPO).

To test the **suitability** of the ELISA detection system EPO contents of serum and plasma samples of dogs (n=31) and cats (n=6) suffering from anaemias and polycythaemias of different genesis were determined.

There was an inverse correlation between EPO level and packed cell volume ($r = -0.7$). Especially high Erythropoietin values were found in animals with aplastic anaemia. Here, sometimes, the EPO level was 1000x higher than the preliminary set upper normal limit. Relative or absolute decreased EPO values were seen in patients suffering from renal anaemia. Animals with polycythaemia vera or secondary polycythaemia had normal to very low levels of Erythropoietin.

These first results with samples of patients strongly suggest that the tested ELISA system allows extended and improved diagnostic and prognostic statements in dogs and cats suffering from anaemias and polycythaemias of different ethiology.

The sensitive and quantitative measurement of EPO in body fluids with the tested ELISA system bases the exact indication for substitution with exogenous administered EPO as soon as careful clinical studies demonstrate the clinical relevance of measurable EPO levels in plasma and serum and of the EPO substitution.