



## Instructions for Use

# ACTH (Adrenocorticotropic Hormone) ELISA

IVD



REF EIA-3647

 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](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distributed by:

**DRG** 

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

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.  
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.  
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos**

1	INTENDED USE.....	3
2	SUMMARY AND EXPLANATION .....	3
3	CLINICAL SIGNIFICANCE.....	3
4	PRINCIPLE OF THE TEST .....	4
5	KIT COMPONENTS.....	4
6	WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS .....	5
7	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE.....	5
8	REAGENT PREPARATION AND STORAGE .....	5
9	ASSAY PROCEDURE .....	6
10	CALCULATION OF RESULTS.....	7
11	QUALITY CONTROL .....	8
12	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	8
13	EXPECTED VALUES.....	8
14	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
1	VERWENDUNGSZWECK.....	11
2	ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG .....	11
3	KLINISCHE BEDEUTUNG .....	11
4	TESTPRINZIP .....	12
5	TESTKIT-KOMPONENTEN .....	12
6	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN .....	13
7	PROBENENTNAHME UND LAGERUNG .....	13
8	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG .....	13
9	TESTVERFAHREN .....	14
10	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE.....	15
11	QUALITÄTSKONTROLLE.....	16
12	GRENZEN DES VERFAHRENS.....	16
13	ERWARTETE WERTE.....	16
14	LEISTUNGSMERKMALE.....	16
1	USO PREVISTO .....	17
2	RIEPILOGO E SPIEGAZIONE.....	17
3	SIGNIFICATO CLINICO.....	17
4	PRINCIPIO DEL TEST.....	18
5	COMPONENTI DEL KIT .....	18
6	AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	19
7	RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE .....	19
8	PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE .....	19
9	PROCEDURA DI ANALISI .....	20
10	CALCOLO DEI RISULTATI.....	21
11	CONTROLLO QUALITÀ.....	22
12	LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA .....	22
13	VALORI PREVISTI.....	22
14	CARATTERISTICHE DELLA PROCEDURA.....	22

1	USO PREVISTO .....	23
2	RESUMEN Y EXPLICACIÓN .....	23
3	TRASCENDENCIA CLÍNICA .....	23
4	PRINCIPIO DE LA PRUEBA .....	24
5	COMPONENTES DEL KIT .....	25
6	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS .....	25
7	RECOPIACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS .....	25
8	PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS.....	26
9	PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS .....	26
10	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS .....	27
11	CONTROL DE CALIDAD .....	28
12	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO .....	28
13	VALORES PREVISTOS.....	28
14	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO.....	28
15	REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA .....	29
	SYMBOLS USED .....	30

## 1 INTENDED USE

The DRG ACTH ELISA is intended for the quantitative determination of ACTH (Adreno-corticotrophic Hormone) in human plasma. This assay is intended for *in vitro* diagnostic use.

## 2 SUMMARY AND EXPLANATION

ACTH (Adrenocorticotrophic hormone) or corticotropin is a 39-amino acid peptide hormone (MW=4500) secreted by the pituitary to regulate the production of steroid hormones by the adrenal cortex. ACTH secretion from the anterior pituitary is controlled by both a classical negative feedback control mechanism and CNS-stress mediated control system. Various types of stress or pain perceived in higher levels of the brain modulate secretion of the hypothalamic neurosecretory hormone, corticotropin releasing hormone (CRH), a 41-amino acid peptide. CRH stimulates pituitary ACTH secretion. The second peptide that modulates ACTH secretion is vasopressin (AVP). AVP secretion is also stimulated by stress and acts synergistically with CRH to increase ACTH secretion in the pituitary portal circulation. ACTH increases the synthesis and release of all adrenal steroids, aldosterone, cortisol and adrenal androgens. It is the principal modulator of cortisol, the most important glucocorticoid in man. As the cortisol level in blood increases, release of ACTH is inhibited directly at the pituitary level. Through this same mechanism, decreasing cortisol levels lead to elevated ACTH levels.<sup>2,3,4,5</sup>

Biologically active ACTH results from enzymatic cleavage of a large precursor molecule, pro-opiomelanocortin (POMC). This molecule contains within its structure the amino acid sequences of ACTH, Pro-ACTH,  $\beta$ -melanocyte stimulating hormone, lipotropin, as well as endorphin and the enkephalins. Because the reaction in immunoassays is determined by antigenic structure, not biological function, the usual ACTH RIA reacts with POMC, Pro-ACTH, ACTH and some fragments of the ACTH.<sup>5</sup>

Like other pituitary hormones, ACTH is secreted in a pulsatile manner. These small pulses are superimposed on a characteristic diurnal fluctuation of greater amplitude. In healthy individuals, ACTH reaches a peak in the early morning (6:00 - 8:00 hour) and levels become lowest late in the day and near the beginning of the sleep period. Because of this diurnal rhythm it is customary to draw plasma ACTH samples between 8:00 and 10:00 hour. However, differentiation of patients with Cushing's disease from normal individuals may be best achieved on samples obtained in the evening (16:00 - 18:00 hour). In Cushing's disease and in ectopic ACTH syndromes, the diurnal pattern of ACTH secretion is generally absent. Stress may also override the diurnal variation.

## 3 CLINICAL SIGNIFICANCE

Plasma ACTH assays are useful in the differential diagnosis of pituitary Cushing's disease, Addison's disease, autonomous ACTH producing pituitary tumors (e.g. Nelson's syndrome), hypopituitarism with ACTH deficiency and ectopic ACTH syndrome.<sup>5,6,7,8,9,10</sup>

Cushing's syndrome is caused by the effects of excess glucocorticoid actions. All causes of Cushing's syndrome, with the exception of glucocorticoid medication, are associated with increased 24-hour urinary cortisol. The most common cause of Cushing's syndrome is bilateral adrenal hyperplasia, due to pituitary ACTH hypersecretion (Cushing's disease) from a pituitary adenoma or corticotroph hyperplasia.<sup>5,6,7,8,9,10</sup> Laboratory diagnosis of Cushing's disease is supported by the following: (1) suppression of plasma ACTH and cortisol concentrations, by high-dose (2.0 mg q 6h x 8) dexamethasone administration, (2) absence of ACTH and cortisol suppression with low-dose (0.5 mg q 6h x 8 or 1 mg given at 23:30 hour) dexamethasone, (3) larger than normal response to metyrapone (Metopirone) stimulation and normal or elevated plasma ACTH levels.<sup>4</sup>

When Cushing's syndrome is caused by primary adrenal abnormality (adenoma or carcinoma), the adrenal gland acts independently of ACTH and pituitary ACTH secretion is suppressed.<sup>5,6,7,8,9,10</sup> Hence, there is no response to dexamethasone suppression or metyrapone stimulation. This type of Cushing's syndrome is characterized by very low, or undetectable levels of ACTH.

Therefore, measurement of plasma ACTH is helpful in differential diagnosis of pituitary Cushing's syndrome. In patients with adrenal tumors, ACTH levels are low. High levels of ACTH are seen in patients with ectopic ACTH syndrome. Patients with bilateral adrenal hyperplasia will have ACTH levels inappropriately elevated for their degree of hypercortisolism, which should suppress ACTH. However, in most cases the ACTH concentration will be within the normal range.

Adrenocortical insufficiency or inadequate cortisol production can be due to destruction of the adrenal cortex or to abnormalities of the pituitary or hypothalamus, which result in inadequate ACTH production or release.<sup>5,6,7,8,9,10</sup> Primary adrenocortical insufficiency, Addison's disease, is characterized by markedly elevated plasma ACTH levels and adrenal unresponsiveness to stimulation with exogenous ACTH. Hypopituitarism with ACTH deficiency, which is secondary adrenocortical insufficiency, is characterized by low plasma ACTH and cortisol concentrations, and a subnormal, but usually distinct adrenal response to stimulation with synthetic ACTH (Cortrosyn<sup>®</sup>). If hypoglycemic stress or metyrapone stimulation is required for diagnosis, ACTH and cortisol responses are less than normal.

Aggressive and invasive ACTH producing pituitary tumors occurring before or following bilateral adrenalectomy for Cushing's disease (Nelson's syndrome) are characterized by the development of Addisonian pigmentation, often in an adrenalectomized patient who is taking adequate glucocorticoid replacement therapy. In these patients, plasma ACTH levels are markedly elevated and do not respond well to dexamethasone suppression.

#### 4 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG ACTH Immunoassay is a two-site ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay] for the measurement of the biologically active 39 amino acid chain of ACTH. A goat polyclonal antibody to human ACTH, purified by affinity chromatography, and a mouse monoclonal antibody to human ACTH are specific for well defined regions on the ACTH molecule. One antibody is prepared to bind only the C-terminal ACTH 34-39 and this antibody is biotinylated. The other antibody is prepared to bind only the mid-region and N-terminal ACTH 1-24 and this antibody is labeled with horseradish peroxidase [HRP] for detection.

Streptavidin Well - Biotinylated Anti-ACTH (34-39) -- ACTH -- HRP conjugated Anti-ACTH (1-24)

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 ACTH in the sample. A dose response curve of absorbance unit vs. concentration is generated using results obtained from the calibrators. Concentrations of ACTH present in the controls and patient samples are determined directly from this curve.

#### 5 KIT COMPONENTS

Kit Components	Description	Quantity
<b>RGT 1</b> = Reagent 1	Biotinylated ACTH Antibody [affinity purified goat anti human ACTH]	1 x 2.7mL
<b>RGT 2</b> = Reagent 2	Peroxidase (Enzyme) labeled ACTH Antibody [mouse monoclonal anti human ACTH]	1 x 2.7 mL
<b>RGT A</b> = ELISA Reagent A	ELISA Wash Concentrate [Saline with surfactant]	1 x 30 mL
<b>RGT B</b> = ELISA Reagent B	TMB Substrate [tetramethylbenzidine]	1 x 15.5 mL
<b>SOLN</b> = Stopping solution	ELISA Stop Solution [1 N sulfuric acid]	1 x 20 mL
<b>PLA</b> = Microplate	One holder with Streptavidin Coated Strips.	12 x 8-well strips
<b>CAL</b> = Calibrators A: 0 pg/mL B: C: Refer to vial labels D: for exact E: concentrations F:	Lyophilized [except zero calibrator] synthetic h-ACTH. Zero calibrator [BSA/equine serum solution] is in liquid form, ready to use. All other calibrators consist of synthetic h-ACTH (1-39) in BSA/equine serum solution	1 x 4 mL for the zero calibrator  1 x 2 mL for all other calibrators
<b>CTRL</b> = Controls 1 & 2 Refer to vial labels for exact ranges	Lyophilized. 2 Levels. Synthetic h-ACTH (1-39) in BSA/equine serum solution.	1 x 2 mL per level

##### 5.1 MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader.
- Microplate washer [if washer is unavailable, manual washing may be acceptable].
- Precision Pipettors to deliver 25, 200, 100 and 150  $\mu$ L.
- (Optional): A multi-channel dispenser or a repeating dispenser for 25, 100 and 150  $\mu$ L.
- 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 $\pm$ 10 rpm
	19 mm (0.75 in)	170 $\pm$ 10 rpm
Linear	2.5 mm (0.098 in)	170 $\pm$ 10 rpm

## 6 WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS

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.

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, with appropriate protective clothing. Any spill should be wiped immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation.

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.

## 7 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The determination of ACTH should be performed on EDTA plasma.

To assay the specimen in duplicate, 400  $\mu$ L of EDTA plasma is required. Collect whole blood in a lavender [EDTA] tube. The plasma should be promptly separated, preferably in a refrigerated centrifuge, and stored at -20 °C or lower.

EDTA plasma samples may be stored up to 8 hours at 2 °C - 8 °C. EDTA plasma samples frozen at -20 °C are stable for up to 4 months.

## 8 REAGENT PREPARATION AND STORAGE

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

1. All reagents except the non-zero calibrators, kit controls and the Wash Concentrate are ready-to-use. Store all reagents at 2 °C - 8 °C, except the Wash Concentrate, which should be kept at room temperature until dilution to avoid precipitation.
2. 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 vial 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 (-20 °C) the remaining calibrators and controls as soon as possible after use.** Standards and controls are stable at -20 °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.

## 9 ASSAY PROCEDURE

1. Place sufficient **Streptavidin Coated Strips** in a holder to run all six (6) calibrators, A - F of the ACTH 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 (-20 °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.

Cover the microplate(s) with aluminum foil or a tray to avoid exposure to light, and place it on a **shaker** set at recommended settings (see section 5.1) for **4 hours ± 30 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 **ELISA Reagent A**), using an automatic microplate washer. Blot dry by inverting the plate on an absorbent material. The wash solution volume should be set to dispense 0.35 mL into each well.
6. Add or dispense **150 µL** of the **ELISA Reagent B** (TMB Substrate) into each of the wells.
7. With appropriate cover to avoid light exposure, place the microplate(s) on a **shaker** set at recommended settings (see section 5.1) 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. Mix gently.
9. Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to **450 nm**. Prior to reading, ensure both "blank wells" as mentioned in Step 1 are filled with 250 µL of distilled or deionized water. **Read the plate again** with the reader set to **405 nm** against distilled or deionized water

*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 500 pg/mL. Hence, patient samples with ACTH > 150 pg/mL 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. In general, patient and control samples should be read using the 450 nm for ACTH concentrations up to 150 pg/mL. ACTH concentrations above 150 pg/mL should be interpolated using the 405 nm reading.*

10. By using the final absorbance values obtained in the previous step, construct a calibration curve via cubic spline, 4 parameter logistics, or point-to-point interpolation to quantify the concentration of the ACTH.

### 9.1 PROCEDURAL NOTES

- ACTH 1-39 is a very labile molecule. Set up the assay immediately upon the reconstitution or the thawing of all calibrators, controls, and patient samples.
- It is recommended that all calibrators, controls, and patient samples are assayed in duplicate. The average absorbance units of duplicate sets should then be used for reduction of data and the calculation of results.
- The samples should be pipetted into the well with minimum amount of air-bubble. To achieve this, "reverse pipet" described in the package insert of the manufacturers of Pipettors is recommended.
- Patient samples with values greater than the highest calibrator (Calibrator F), which is approximately 500 pg/mL (see exact concentration on vial label), may be diluted with Calibrator A (Zero Calibrator) and reassayed. Multiply the result by the dilution factor.
- 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, 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 with orbital shaker.
- When mixing avoid splashing of reagents from wells. This will affect assay precision and accuracy

## 10 CALCULATION OF RESULTS

### 10.1 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 the three calibrators with the highest concentrations, i.e. Calibrators D, E and F.
- Assign the concentration for each calibrator stated on the vial in pg/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 ACTH concentrations up to 150 pg/mL. ACTH concentrations above 150 pg/mL should be interpolated using the 405 nm reading.

### 10.2 Automated Method

Computer programs using cubic spline or 4 PL [4 Parameter Logistics] or Point-to-Point can generally give a good fit.

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

Microplate Well	1 <sup>st</sup> Reading Absorbance Unit	2 <sup>nd</sup> Reading Absorbance Unit	Average Absorbance Unit	ACTH pg/mL	ACTH pg/mL – Result to report
Calibrator A	0.020	0.018	0.019		0
Calibrator B	0.077	0.074	0.076		5
Calibrator C	0.221	0.229	0.225		18
Calibrator D	0.624	0.692	0.685		55
Calibrator E	1.802	1.934	1.868		165
Control 1	0.417	0.398	0.408	33.5	33.5
Control 2	2.868	2.774	2.821	> 150	*
Patient Sample 1	0.072	0.078	0.075	4.9	4.9
Patient Sample 2	0.185	0.177	0.181	14.0	14.0
Patient Sample 3	0.495	0.491	0.493	40.8	40.8
Patient Sample 4	2.090	2.122	2.106	> 150	*

\* Because the concentration readout is > 150 pg/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 <sup>st</sup> Reading Absorbance Unit	2 <sup>nd</sup> Reading Absorbance Unit	Average Absorbance Unit	ACTH pg/mL	ACTH pg/mL – Result to report
Calibrator A	0.011	0.008	0.0095		0
Calibrator D	0.032	0.032	0.032		55
Calibrator E	0.074	0.081	0.078		165
Calibrator F	1.838	1.817	1.828		500
Control 1	0.138	0.132	0.135	< 150	¶
Control 2	0.921	0.894	0.908	256	256
Patient Sample 1	0.030	0.032	0.031	< 150	¶
Patient Sample 2	0.068	0.062	0.065	< 150	¶
Patient Sample 3	0.165	0.159	0.162	< 150	¶
Patient Sample 4	0.663	.677	0.670	188	188

¶ For samples with readout < 150 pg/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.



**11 QUALITY CONTROL**

Control plasma or plasma 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. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

**12 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

The ACTH ELISA kit has exhibited no "high dose hook effect" with samples spiked with 20,000 pg/mL of ACTH. Samples with ACTH levels greater than the highest calibrator, however, should be diluted and reassayed for correct values.

Like any analyte used as a diagnostic adjunct, ACTH results must be interpreted carefully with the overall clinical presentations and other supportive diagnostic tests.

Samples from patients routinely exposed to animal or animal serum products may contain heterophilic antibodies causing atypical results. This assay has been formulated to mitigate the risk of this type of interference. However, potential interactions between rare sera and test components can occur.

**13 EXPECTED VALUES**

ACTH levels were measured in one hundred and thirty four (134) apparently normal individuals in the U.S. with the ACTH ELISA. The values obtained ranged from 7.0 to 63 pg/mL. Based on statistical tests on skewness and kurtosis, the population, when transformed logarithmically, follows the normal or Gaussian distribution.

The geometric mean  $\pm$  2 standard deviations of the mean were calculated to be 6.17 to 58.2 pg/mL.

**14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS****14.1 Accuracy**

Three hundred (300) patient samples, with ACTH values ranging from 1.0 to 640 pg/mL were assayed by the previous DRG ACTH kit and the updated DRG ACTH kit ELISA. Linear regression analysis gives the following statistics:

ACTH ELISA (EIA-3647) = 1.02 - 1.58 pg/mL

$r = 0.995$        $N = 300$

**14.2 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 ACTH ELISA (EIA-3647) has a calculated sensitivity of 0.22 pg/mL.

**14.3 Precision and Reproducibility**

The precision (intra-assay variation) of the ACTH ELISA Test was calculated from 25 replicate determinations on each of the two samples.

**Intra-Assay Variation**

Sample	Mean Value (pg/mL)	N	Coefficient of variation %
A	42.2	25	6.71
B	269.9	25	2.27

The total precision (inter-assay variation) of the ACTH ELISA Test was calculated from data on two samples obtained in 21 different assays, by three technicians on three different lots of reagents, over a four-week period

**Inter-Assay Variation**

Sample	Mean Value (pg/mL)	N	Coefficient of variation %
A	42.3	21	7.1
B	287.8	21	6.9

#### 14.4 Specificity and Cross-Reactivity

Cross-reactivity in the ACTH was studied by the addition of various materials to an ACTH standard. The results are as follows:

Cross-reactant	Concentration of Cross-reactant	ACTH without Cross-reactant [pg/mL]	ACTH With Cross-reactant [pg/mL]	Change in ACTH [pg/mL]	% Cross-reactivity
ACTH (1-24)	100 000 pg/mL	62.9	0.8	-62.1	-0.06 %
	10 000 pg/mL	62.9	5.05	-57.85	-0.58 %
	1000 pg/mL	62.9	28.6	-34.3	-3.43 %
	200 pg/mL	62.9	43.4	-19.5	-9.75 %
ACTH (18-39)	5000 pg/mL	61.2	2	-59.2	-1.2 %
	2000 pg/mL	61.2	13.6	-47.6	-2.4 %
	500 pg/mL	61.2	24.3	-36.9	-7.4 %
a-MSH	100 000 pg/mL	88.1	65.7	-22.4	-0.02 %
	10 000 pg/mL	88.1	69.1	-19	-0.19 %
	1000 pg/mL	88.1	70.7	-17.4	-1.7 %
	200 pg/mL	88.1	74.8	-13.3	-6.7 %
b-ENDORPHIN	100 000 pg/mL	73.8	60.5	-13.3	-0.01 %
	50 000 pg/mL	73.8	56.9	-16.9	-0.03 %

#### 14.5 Recovery

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

Plasma Sample	Endogenous ACTH (pg/mL)	ACTH added (pg/mL)	Expected Value (pg/mL)	Measured Value (pg/mL)	Recovery (%)
A	13.3	50.0	63.3	62.4	99 %
		100.0	113.5	116	102 %
B	17.7	50.0	67.7	62.1	92 %
		100.0	117.7	121.7	103 %
C	14.8	50.0	64.8	64.2	99 %
		100.0	114.8	114.2	99 %
D	27.1	50.0	77.1	67.4	87 %
		100.0	127.1	119	94 %

#### 14.6 Kinetic Effect of the Assay

To determine whether there is any systematic kinetic effect between the beginning of the run and the end of the run, three spiked patient pools, selected to represent a good cross section of the ACTH concentration, were placed in sequence throughout the run of one microplate or 96 wells [with twelve 8-well strips].

**14.7 Linearity of Patient Sample Dilutions: Parallelism**

Five patient plasma samples were diluted with Calibrator A (Zero Calibrator). Results in pg/mL are shown below:

Sample	Dilution	Expected pg/mL	Observed pg/mL	% Observed ÷ Expected
A	Undiluted	-	288	-
	1:2	144	150	104%
	1:4	72	70.9	98%
	1:8	36	35.7	99%
B	Undiluted	-	468	-
	1:2	234	278	119%
	1:4	117	135	115%
	1:8	58.5	65.5	112%
C	Undiluted	-	270	-
	1:2	135	146	108%
	1:4	67.5	68	101%
	1:8	33.75	33.5	99%
D	Undiluted	-	336	-
	1:2	168	149	89%
	1:4	84	83	99%
	1:8	42	47	112%
E	Undiluted	-	452	-
	1:2	226	268	119%
	1:4	113	126	112%
	1:8	56.5	68.9	122%

## 1 VERWENDUNGSZWECK

Der ACTH ELISA dient der quantitativen Bestimmung von ACTH (adrenocorticotropem Hormon) in Humanplasma. Dieser Assay ist für die *in vitro*-Diagnostik vorgesehen.

## 2 ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

ACTH (adrenocorticotropes Hormon) oder Corticotropin ist ein Peptidhormon (MG=4500) aus 39 Aminosäuren, das von der Hypophyse zur Regulierung der Steroidhormonproduktion in der Nebennierenrinde abgegeben wird. Die ACTH-Sekretion durch den Hypophysenvorderlappen wird sowohl mittels eines klassischen negativen Rückkopplungsmechanismus als auch von einem Kontrollsystem, das ZNS-Reize übermittelt, gesteuert.<sup>1</sup> Unterschiedliche, in übergeordneten Ebenen des Gehirns wahrgenommene Formen von Stress oder Schmerzen beeinflussen die Sekretion des hypothalamischen neurosekretorischen Hormons CRH (Corticotropin Releasing Hormon), einem Peptid aus 41 Aminosäuren. CRH stimuliert die Ausschüttung von ACTH in der Hypophyse. Das zweite Peptid, das die ACTH-Sekretion beeinflusst, ist Vasopressin (ADH). Die ADH-Sekretion wird ebenfalls durch Reize angeregt. ADH und CRH bewirken synergistisch eine gesteigerte ACTH-Ausschüttung im Pfortaderkreislauf der Hypophyse. ACTH steigert die Bildung und Freisetzung aller in der Nebennierenrinde gebildeten Steroidhormone, wie Aldosteron, Kortisol und Androgene. ACTH ist der wesentlichste Modulator von Kortisol, dem für den Menschen wichtigsten Glucocorticoid. Wenn der Kortisolspiegel im Blut steigt, wird die ACTH-Ausschüttung direkt auf Hypophysenebene gehemmt. Über denselben Mechanismus führen sinkende Kortisolspiegel zu erhöhten ACTH-Spiegeln.<sup>2,3,4,5</sup>

Biologisch aktives ACTH ist das Ergebnis einer enzymatischen Spaltung von Proopiomelanocortin (POMC), eines großen Vorläufermoleküls. Dieses Molekül beinhaltet in seiner Struktur die Aminosäuresequenzen von ACTH, Pro-ACTH,  $\beta$ -Melanozyten-stimulierendem Hormon, Lipoprotein sowie Endorphin und den Enkephalinen. Da die Reaktion in Immunoassays durch die antigene Struktur und nicht durch die biologische Funktion bestimmt wird, kommt es im üblichen ACTH RIA zu Reaktionen mit POMC, Pro-ACTH, ACTH und einigen ACTH-Fragmenten.<sup>5</sup>

Wie andere Hypophysenhormone wird ACTH pulsweise freigegeben. Diese minimalen Ausschüttungen werden von einem charakteristischen zirkadianen Rhythmus überlagert. Bei gesunden Personen erreicht die ACTH-Konzentration früh am Morgen (6:00 – 8:00 Uhr) einen Höhepunkt, während die Konzentrationen spät am Abend und kurz vor dem Einschlafen am niedrigsten sind. Auf Grund dieses Tagesrhythmus werden Plasma-ACTH-Proben üblicherweise zwischen 8:00 und 10:00 Uhr entnommen. Eine Abgrenzung gesunder Personen gegen Patienten mit Cushing-Syndrom ist jedoch am ehesten gewährleistet, wenn die Proben abends (16:00 – 18:00 Uhr) entnommen werden. Beim Vorliegen des Cushing-Syndroms und bei ektopischen ACTH-Syndromen ist die an den Tagesrhythmus gebundene ACTH-Sekretion für gewöhnlich aufgehoben. Auch durch Stress kann es zu einer Störung dieses Rhythmus kommen.

## 3 KLINISCHE BEDEUTUNG

Plasma-ACTH-Tests eignen sich für die Differentialdiagnose von hypophysär bedingtem Cushing-Syndrom, Addison-Krankheit, durch autonomes ACTH verursachten Hypophysentumoren (z.B. Nelson-Tumor), Hypophysenunterfunktion mit ACTH-Mangel und ektopischem ACTH-Syndrom.<sup>5,6,7,8,9,10</sup>

Das Cushing-Syndrom wird durch ein Überangebot von Glucocorticoiden verursacht. Alle Ursachen des Cushing-Syndroms, mit Ausnahme der therapeutischen Verabreichung von Glucocorticoiden, gehen mit erhöhten 24 h-Harn-Kortisolwerten einher. Die häufigste Ursache des Cushing-Syndroms ist die bilaterale Nebennierenhyperplasie, verursacht durch eine hypophysäre ACTH-Hypersekretion (Morbus Cushing) eines Hypophysen-Adenoms oder einer corticotrophen Hyperplasie.<sup>5,6,7,8,9,10</sup> Eine labortechnische Diagnose des Cushing-Syndroms wird durch folgende Beobachtungen bestätigt: (1) Suppression der Konzentrationen von Plasma-ACTH und Kortisol bei hochdosierter Gabe von Dexamethason (2,0 mg alle 6 Stunden über 8 Tage), (2) fehlende Suppression von ACTH und Kortisol bei geringdosierter Gabe von Dexamethason (0,5 mg alle 6 Stunden über 8 Tage oder 1 mg verabreicht um 23:30 Uhr), (3) stärkere Antwort als normal auf Metyrapon- (Metopiron®) Stimulation sowie normale bzw. erhöhte Plasma-ACTH-Spiegel.<sup>4</sup>

Wird das Cushing-Syndrom durch primäre Nebennierentumoren (Adenom oder Karzinom) verursacht, funktionieren die Nebennieren unabhängig von ACTH und die hypophysäre ACTH-Sekretion wird supprimiert.<sup>5,6,7,8,9,10</sup> Es kommt daher zu keiner Reaktion auf eine Dexamethason-Suppression oder eine Metyrapon-Stimulation. Diese Form des Cushing-Syndroms ist durch sehr niedrige bzw. nicht nachweisbare Konzentrationen von ACTH charakterisiert.

Aus diesem Grund ist die Messung des Plasma-ACTH für die Differentialdiagnose des hypophysären Cushing-Syndroms hilfreich. Bei Patienten mit Nebennierentumoren sind die ACTH-Konzentrationen niedrig. Hohe Konzentrationen an ACTH können bei Patienten mit ektopischem ACTH-Syndrom beobachtet werden. Patienten mit bilateraler Nebennierenhyperplasie weisen für ihren Grad an Hyperkortisolismus, der ACTH hemmen sollte, übermäßig hohe ACTH-Spiegel auf. In den meisten Fällen liegt die ACTH-Konzentration jedoch im Normbereich.

Nebennierenrindeninsuffizienz oder inadäquate Kortisolproduktion können durch die Zerstörung der Nebennierenrinde oder Tumoren der Hypophyse oder des Hypothalamus verursacht sein, wodurch es zu einer inadäquaten ACTH-Produktion bzw. Freisetzung kommt. Die primäre Nebennierenrindeninsuffizienz, Morbus Addison, ist durch erheblich erhöhte Plasma-ACTH-Spiegel und ein Ausbleiben der Reaktion auf eine Stimulation der Nebennieren mit exogenem ACTH gekennzeichnet. Die sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienz, eine Unterfunktion der Hypophyse mit ACTH-

Mangel, ist durch geringe Konzentrationen von Plasma-ACTH und Kortisol gekennzeichnet sowie eine subnormale, gewöhnlich jedoch erkennbare Reaktion auf eine Stimulation der Nebennieren mit synthetischem ACTH (Cortrosyn®). Wenn die Diagnose nur durch Auslösung einer künstlichen Hypoglykämie oder durch eine Metyrapon-Stimulation gestellt werden kann, fallen die ACTH- und Kortisol-Reaktionen schwächer als normal aus.

Aggressive und invasive ACTH-produzierende Hypophysentumoren vor oder im Anschluss an eine bilaterale Adrenalektomie bei Cushing-Syndrom (Nelson-Tumor) zeichnen sich durch die Entwicklung einer Addison-Pigmentierung aus. Diese ist häufig bei Patienten zu beobachten, die nach einer Adrenalektomie im Rahmen einer Substitutionstherapie ausreichend Glucocorticoide zuführen. Bei diesen Patienten sind die Plasma-ACTH-Spiegel erheblich erhöht und reagieren kaum auf eine Dexamethason-Suppression.

#### 4 TESTPRINZIP

Der ACTH Immunoassay ist ein an zwei Stellen ansetzender ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay] zur Messung des biologisch aktiven, 39 Aminosäuren langen adrenocorticotropen Hormons (ACTH). Ein polyklonaler Ziege-Antikörper gegen humanes ACTH, affinitätschromatographisch gereinigt, und ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes ACTH sind für hinreichend definierte Regionen des ACTH-Moleküls spezifisch. Ein Antikörper ist nur regionsspezifisch gegen C-terminales ACTH 34-39. Dieser Antikörper ist biotinyliert. Der andere Antikörper ist nur regionsspezifisch gegen mittregionales und N-terminales ACTH 1-24. Dieser Antikörper ist als Detektionsantikörper mit Meerrettich-Peroxidase [HRP] markiert.

Streptavidin-beschichtete Vertiefung – Biotinyliertes Anti-ACTH 34-39 – ACTH – HRP-gekoppeltes Anti-ACTH 1-24

In diesem Assay werden Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben gleichzeitig mit dem enzymgekoppelten Antikörper und einem Biotin-gekoppelten Antikörper in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatten 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 ACTH in der Probe. Unter Verwendung der mit den Kalibratoren ermittelten Ergebnisse wird eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit Absorptionseinheiten gegenüber Konzentrationen erstellt. Die ACTH-Konzentrationen in Kontrollen und Patientenproben werden direkt aus dieser Kurve ermittelt.

#### 5 TESTKIT-KOMPONENTEN

Testkit-Komponenten	Bezeichnung	Menge
<b>REAG 1</b> = Reagenz 1	Biotinylierter ACTH-Antikörper [affinitätsgereinigter Ziege-Antikörper gegen h-ACTH]	1 x 2,7 mL
<b>RGT 2</b> = Reagenz 2	Peroxidase- (Enzym) gekoppelter ACTH-Antikörper [monoklonaler Maus-Antikörper gegen h-ACTH]	1 x 2,7 mL
<b>RGT A</b> = ELISA Reagenz A	ELISA Waschkonzentrat [saliner Puffer mit Detergens]	1 x 30 mL
<b>RGT B</b> = Reagenz B	TMB-Substrat [Tetramethylbenzidin]	1 x 15,5 mL
<b>SOLN</b> = Stopplösung	ELISA Stopplösung [1 N Schwefelsäure]	1 x 20 mL
<b>PLA</b> = Mikrotiterplatte	Eine Halterung mit Streptavidin-beschichteten Streifen	12 Streifen à 8 Vertiefungen
<b>CAL</b> = Kalibratoren A: 0 pg/mL B: C: <i>Genaue Konzentration</i> D: <i>auf den</i> E: <i>Flaschenetiketten</i> F:	Lyophilisiertes [mit Ausnahme des Nullkalibrators] synthetisches h-ACTH. Nullkalibrator [BSA/Pferdeserum-Lösung] in flüssiger Form, gebrauchsfertig. Alle anderen Kalibratoren enthalten synthetisches h-ACTH 1-39 in BSA/Pferdeserum-Lösung.	1 x 4 mL für den Nullkalibrator  1 x 2 mL für alle anderen Kalibratoren
<b>CTRL</b> = Kontrollen 1 & 2 <i>Genaue Bereiche auf Flaschenetiketten.</i>	Lyophilisiert. 2 Level. Synthetisches h-ACTH 1-39 in BSA/Pferdeserum-Lösung.	1 x 2 mL je Level

### 5.1 Weitere erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Lesegerät
- Mikrotiterplatten-Waschgerät [falls nicht verfügbar, ist manuelle Wäsche zulässig]
- Präzisionspipetten zur Pipettierung von 25, 200, 100 und 150 µL
- (*Optional*): Mehrkanaldispenser bzw. Repetierpipette für 25, 100 und 150 µL
- 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 U/min
	19 mm (0.75 in)	170 ± 10 U/min
Linear	2.5 mm (0.098 in)	170 ± 10 U/min

## 6 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

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.

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.

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.

## 7 PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

Die Bestimmung von ACTH sollte mit EDTA-Plasma erfolgen.

Um die Proben in Doppelbestimmung zu testen, werden 400 µL EDTA-Plasma benötigt. Vollblut in einem Reagenzglas mit violettem Stopfen [enthält EDTA] sammeln. Das Plasma ist sofort zu separieren, vorzugsweise in einer Kühlzentrifuge, und bei -20 °C oder kälter zu lagern. EDTA-Plasmaproben können bei 2 °C - 8 °C bis zu 8 Stunden gelagert werden. Auf -20 °C tiefgefrorene EDTA-Plasmaproben sind bis zu 4 Monate stabil.

## 8 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

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

1. Alle Reagenzien mit Ausnahme der Nicht-Nullkalibratoren, Testkit-Kontrollen und dem Waschkonzentrat sind gebrauchsfertig. Alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C lagern.
2. 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. Flasche 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. Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-20 °C).** Standards und Kontrollen sind 6 Wochen nach Rekonstitution bei -20 °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 der Niederschlag durch Platzieren des Gefäßes in ein Wasserbad bei 37 °C oder einen Laborofen 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.

## 9 TESTVERFAHREN

1. Eine für alle sechs (6) Kalibratoren, A – F der ACTH -KALIBRATOREN [genaue Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten vermerkt], Kontrollen und Patientenproben ausreichende Anzahl Streptavidin-beschichteter Streifen in die Halterung einsetzen.  
Verwenden Sie zwei Vertiefungen als "Leerwert". Siehe Schritt #9 dieses Abschnitts.
2. **200 µL** der Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die dafür vorgesehene bzw. gekennzeichnete Vertiefung pipettieren. **Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (- 20 °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(n) mit Aluminiumfolie oder einem Deckel abdecken, um Licht fernzuhalten. Platte **4 Stunden ± 30 Minuten** bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) **auf einem Schüttler** inkubieren, wobei der Schüttler auf die empfohlenen Werte eingestellt ist (siehe Abschnitt 5.1)
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.
7. Mikrotiterplatte(n) mit einer entsprechenden Abdeckung zur Vermeidung von Lichteinstrahlung **30 ± 5 Minuten** bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) **auf einem Schüttler** inkubieren, wobei der Schüttler auf die empfohlenen Werte eingestellt ist (siehe Abschnitt 5.1).
8. **100 µL** der Stopplösung in jede der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Vorsichtig mischen.
9. Innerhalb von 10 Minuten Absorption der Lösung in den Vertiefungen bei **450 nm** im Mikrotiterplatten-Lesegerät. Vor dem Messen, sicherstellen, dass die Vertiefungen für den "Leerwert" (siehe Schritt #1) mit 250 µL destilliertes oder deionisiertes Wasser gefüllt sind. Anschließend noch einmal bei einer Wellenlänge von **405 nm**.

***Hinweis:** Die zweite Messung erfolgt, um die analytische Gültigkeit der Kalibrationskurve auf den höchsten Kalibratorwert (ca. 500 pg/mL) auszudehnen. Somit können Patientenproben mit ACTH > 150 pg/mL 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. Im Allgemeinen sind Patienten- und Kontrollproben bei ACTH-Konzentrationen von bis zu 150 pg/mL bei 450 nm abzulesen. ACTH-Konzentrationen oberhalb von 150 pg/mL werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.*

10. Unter Verwendung der im vorherigen Schritt ermittelten endgültigen Absorptionswerte kann eine Kalibrationskurve mittels kubischer Splines, 4-Parameter Logistik oder Punkt-zu-Punkt-Interpolation zur Quantifizierung der ACTH-Konzentration erstellt werden.

### 9.1 VERFAHRENSTECHNISCHE HINWEISE

- ACTH 1-39 ist ein sehr instabiles Molekül. Sofort nach Rekonstitution bzw. Auftauen sämtlicher Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben mit dem Test beginnen.
- Es wird empfohlen, alle Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmung zu testen. Für die Datenreduktion und die Berechnung der Ergebnisse sind dann die mittleren Absorptionseinheiten der doppelbestimmten Reihen zu verwenden.
- Die Proben sollten bei minimaler Luftbildung in die Vertiefungen pipettiert werden. Dies wird durch Umkehren des Pipettiervorgangs erreicht, wie in der Pipetten-Packungsbeilage beschrieben.
- Patientenproben mit einer höheren Konzentration als der höchsten Kalibratorkonzentration (Kalibrator F) von ca. 500 pg/mL (genaue Konzentrationsangabe auf dem Flaschenetikett) sind mit Kalibrator A (Nullkalibrator) zu verdünnen und erneut zu testen. Das Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.
- Nur Reagenzien einer Charge verwenden.
- 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. Anschließend 50 µL des Gemischs in jede Vertiefung pipettieren. Diese Methode ersetzt Schritt (3) und (4). Darauf folgt die Inkubation im Orbitalschüttler.
- 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.

**10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE****10.1 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 drei Kalibratoren mit den höchsten Konzentrationen, d.h. Kalibrator D, E und F.
2. Jedem Kalibrator die auf dem Fläschchen in pg/mL angegebene Konzentration zuweisen. 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 ACTH-Konzentrationen von bis zu 150 pg/mL bei 450 nm zu messen. ACTH-Konzentrationen oberhalb von 150 pg/mL werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.

**10.2 Automatisch**

Computerprogramme, die mit kubischen Splines, 4 PL [4-Parameter Logistik] oder Punkt-zu-Punkt-Interpolation arbeiten, liefern erfahrungsgemäß gute Ergebnisse.

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

Mikrotiterplatten-Vertiefung	1.Messung Absorptionseinheit	2.Messung Absorptionseinheit	Mittlere Absorptionseinheit	ACTH pg/mL	ACTH pg/mL- Anzugebendes Ergebnis
Kalibrator A	0,020	0,018	0,019		0
Kalibrator B	0,077	0,074	0,076		5
Kalibrator C	0,221	0,229	0,225		18
Kalibrator D	0,624	0,692	0,685		55
Kalibrator E	1,802	1,934	1,868		165
Kontrolle 1	0,417	0,398	0,408	33,5	33,5
Kontrolle 2	2,868	2,774	2,821	> 150	*
Patientenprobe 1	0,072	0,078	0,075	4,9	4,9
Patientenprobe 2	0,185	0,177	0,181	14,0	14,0
Patientenprobe 3	0,495	0,491	0,493	40,8	40,8
Patientenprobe 4	2,090	2,122	2,106	> 150	*

\* Da die gemessene Konzentration > 150 pg/mL ist, 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. Messung Absorptionseinheit	2. Messung Absorptionseinheit	Mittlere Absorptionseinheit	ACTH pg/mL	ACTH pg/mL- nzugebendes Ergebnis
Kalibrator A	0,011	0,008	0,0095		0
Kalibrator D	0,032	0,032	0,032		55
Kalibrator E	0,074	0,081	0,078		165
Kalibrator F	1,838	1,817	1,828		500
Kontrolle 1	0,138	0,132	0,135	< 150	¶
Kontrolle 2	0,921	0,894	0,908	256	256
Patientenprobe 1	0,030	0,032	0,031	< 150	¶
Patientenprobe 2	0,068	0,062	0,065	< 150	¶
Patientenprobe 3	0,165	0,159	0,162	< 150	¶
Patientenprobe 4	0,663	0,677	0,670	188	188



¶ Für Proben mit einem Messwert < 150 pg/mL sollten die bei 450 nm ermittelten Werte angegeben werden, wie sie oben in der Tabelle **Beispieldaten** bei 450 nm aufgeführt sind. Durch diese Vorgehensweise wird die bestmögliche Sensitivität erreicht.

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

## 11 QUALITÄTSKONTROLLE

Kontrollplasmen oder Plasmapools 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. Liegen bei einem Test einer oder mehrere der Probenwerte für die Qualitätskontrolle außerhalb des Akzeptanzbereichs, sind die Ergebnisse der Patientenproben möglicherweise ungültig.

## 12 GRENZEN DES VERFAHRENS

Das ACTH ELISA Testkit zeigt keinen „High-dose-hook-Effekt“ bei Proben, die mit 20 000 pg/mL ACTH versetzt sind. Proben mit ACTH-Konzentrationen höher als die des höchsten Kalibrators sind jedoch zu verdünnen und erneut auf korrekte Werte zu testen.

Wie jeder als diagnostisches Hilfsmittel verwendete Analyt sind ACTH-Ergebnisse sorgfältig unter Berücksichtigung des gesamten klinischen Erscheinungsbildes des Patienten und weiteren unterstützenden diagnostischen Tests zu interpretieren.

Proben von Patienten, die regelmäßig Tier- oder Tierserumprodukten ausgesetzt sind, können heterophile Antikörper enthalten, welche zu atypischen Ergebnissen führen. Dieser Assay wurde so formuliert, dass das Risiko einer solchen Art der Ergebnisbeeinflussung abgeschwächt ist. Dennoch können Wechselwirkungen zwischen seltenen Seren und Testkomponenten auftreten.

## 13 ERWARTETE WERTE

Mithilfe des ACTH ELISA (EIA-3647) wurden in den USA bei einhundertvierunddreißig (134) scheinbar gesunden Probanden ACTH-Konzentrationen gemessen.

Die ermittelten Werte lagen in einem Bereich von 7,0 bis 63 pg/mL.

Wird die Population logarithmisch transformiert, so folgt sie in ihrem statistischen Schiefe- und Exzessverhalten der Normal- oder Gauss-Verteilung. Das geometrische Mittel  $\pm$  2 Standardabweichungen vom Mittelwert ergab einen Bereich von 6,17 bis 58,2 pg/mL.

## 14 LEISTUNGSMERKMALE

### 14.1 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 ACTH ELISA hat eine berechnete Empfindlichkeit von 0,22 pg/mL.

Weitere Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung

## 1 USO PREVISTO

Il test ACTH ELISA è volto alla determinazione quantitativa di ACTH (ormone adrenocorticotropo) nel plasma umano. Questo tipo di analisi è destinato all'impiego diagnostico *in vitro*.

## 2 RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

L'ACTH (ormone adrenocorticotropo) o corticotropina è un ormone polipeptidico formato da 39 aminoacidi (MW=4500), secreto dall'ipofisi per regolare la produzione di ormoni steroidi da parte della corteccia surrenale. La secrezione di ACTH da parte dell'ipofisi anteriore è controllata sia da un meccanismo classico a feedback negativo sia da un sistema di controllo mediato dallo stress del sistema nervoso centrale<sup>1</sup>. Vari tipi di stress o di algia percepiti a livelli più alti del cervello modulano la secrezione dell'ormone ipotalamico, che stimola il rilascio della corticotropina (CRH), un peptide di 41 aminoacidi. La CRH stimola la secrezione ipofisaria di ACTH. Il secondo peptide che modula la secrezione di ACTH è la vasopressina (AVP). La secrezione di AVP è stimolata tra l'altro dallo stress e agisce in sinergia con la CRH per aumentare la secrezione di ACTH nella circolazione portale ipofisaria. L'ACTH aumenta la sintesi e il rilascio di tutti gli steroidi surrenali, aldosterone, cortisolo e androgeni surrenali. È il modulatore principale di cortisolo, il glucocorticoide più importante nell'uomo. L'aumento di cortisolo nel sangue fa sì che il rilascio di ACTH sia inibito direttamente a livello dell'ipofisi. Attraverso lo stesso meccanismo, una diminuzione dei livelli di cortisolo comporta l'aumento dei livelli di ACTH<sup>2,3,4,5</sup>.

L'ACTH biologicamente attivo deriva dalla proteolisi enzimatica di una grossa molecola precursore, la proopiomelanocortina (POMC). Questa molecola contiene le sequenze aminoacidiche dei seguenti ormoni: ACTH, Pro-ACTH,  $\beta$ -melanotropina, lipotropina, endorfina ed encefaline. Poiché nei saggi immunoenzimatici la reazione è determinata dalla struttura antigenica e non dalla funzione biologica, il dosaggio radioimmunologico ACTH RIA reagisce con gli ormoni POMC, Pro-ACTH, ACTH e con alcuni frammenti dell'ACTH<sup>5</sup>.

Analogamente ad altri ormoni ipofisari, l'ACTH è secreto in modo pulsatile, con un andamento periodico caratterizzato da un picco di secrezione durante il giorno. In individui sani, l'ACTH raggiunge i massimi livelli nelle prime ore del mattino (6:00 ~ 8:00), abbassandosi al minimo in serata e all'inizio del sonno. A causa di questo ritmo diurno, generalmente i campioni di ACTH plasmatico vengono prelevati tra le ore 8:00 e 10:00. Tuttavia, per differenziare al meglio pazienti affetti da sindrome di Cushing da individui sani, i campioni vanno prelevati la sera (tra le 16:00 e le 18:00). Infatti, nella sindrome di Cushing e nella sindrome da ACTH ectopico scompare in genere l'andamento diurno della secrezione di ACTH. Anche lo stress può annullare il ritmo circadiano dell'ACTH.

## 3 SIGNIFICATO CLINICO

I saggi ACTH plasmatici sono utili nella diagnosi differenziale di malattia di condizioni quali malattia di Cushing ipofisaria, morbo di Addison, tumori ipofisari ACTH-secerntenti (es. sindrome di Nelson), ipopituitarismo con deficit di ACTH e sindrome da ACTH ectopico<sup>5,6,7,8,9,10</sup>.

La sindrome di Cushing è prodotta da ipersecrezione di glucocorticoidi. Tutte le cause di questa sindrome, ad eccezione della terapia con glucocorticoidi, sono associate ad un aumento del cortisolo urinario delle 24 ore. L'origine più comune della sindrome di Cushing è l'iperplasia bilaterale surrenale, dovuta a un'ipersecrezione ipofisaria di ACTH (malattia di Cushing) da adenoma ipofisario o iperplasia corticosurrenale<sup>5,6,7,8,9,10</sup>. La diagnosi di laboratorio della malattia di Cushing è avvalorata dalle seguenti condizioni: (1) soppressione delle concentrazioni di ACTH plasmatico e di cortisolo, mediante somministrazione di desametasone ad alta dose (2,0 mg q 6h x 8); (2) assenza di soppressione di ACTH e cortisolo a basse dosi di desametasone (0,5 mg q 6h x 8 o 1 mg somministrato alle ore 23:30); (3) risposta superiore al normale allo stimolo con metirapone (Metopirone) e livelli di ACTH plasmatico normali o elevati<sup>4</sup>.

Qualora la sindrome di Cushing sia dovuta ad un'anomalia surrenale primaria (adenoma o carcinoma), la ghiandola surrenale agisce indipendentemente dall'ACTH e la secrezione ipofisaria di ACTH scompare<sup>5,6,7,8,9,10</sup>. Pertanto non si verifica una risposta alla soppressione con desametasone o allo stimolo con metirapone. Questo tipo di sindrome di Cushing è caratterizzato da livelli molto bassi o addirittura non rilevabili di ACTH.

Per questi motivi la misurazione dell'ACTH plasmatico è utile per la diagnosi differenziale della sindrome di Cushing ipofisaria. Nei pazienti affetti da tumori surrenali, i livelli di ACTH risultano molto bassi, mentre nei pazienti con sindrome da ACTH ectopico si riscontrano alti livelli di ACTH. I pazienti che manifestano iperplasia bilaterale surrenale presenteranno livelli ACTH eccessivamente elevati per il grado di ipercortisolismo, che in genere sopprime ACTH. Tuttavia, nella maggioranza dei casi la concentrazione di ACTH rientra nei limiti normali.

Un'insufficienza corticosurrenale o una produzione inadeguata di cortisolo possono essere dovute alla distruzione della corteccia surrenale o da anomalie dell'ipofisi o dell'ipotalamo, che determinano una produzione di ACTH insufficiente<sup>5,6,7,8,9,10</sup>. L'insufficienza corticosurrenale primaria (morbo di Addison), è caratterizzata da livelli di ACTH plasmatico estremamente elevati e da una mancata risposta surrenale allo stimolo con ACTH esogeno. L'ipopituitarismo con deficit di ACTH, un'insufficienza corticosurrenale secondaria, è caratterizzata da basse concentrazioni di ACTH plasmatico e di cortisolo, e da una risposta subnormale ma generalmente distinta allo stimolo con ACTH sintetico (Cortrosyn®). Nel caso in cui la diagnosi richieda stress ipoglicemico o stimolo con metirapone, le risposte all'ACTH e al cortisolo risultano inferiori al normale.

I tumori ipofisari aggressivi e invasivi ACTH-secerntenti che si manifestano prima o dopo surrenalectomia bilaterale per malattia di Cushing (sindrome di Nelson) sono caratterizzati dallo sviluppo di una pigmentazione addisoniana, in particolare nel paziente che in seguito a surrenalectomia è sottoposto a terapia sostitutiva con glucocorticoidi. In questi pazienti, i livelli di ACTH sono estremamente elevati e la risposta alla soppressione con desametasone non è positiva.

#### 4 PRINCIPIO DEL TEST

Il saggio immunoenzimatico ACTH di DRG è un test ELISA (saggio di immunoassorbimento con enzima coniugato) a doppio anticorpo per la misurazione della catena di 39 aminoacidi biologicamente attiva dell'ACTH. Un anticorpo policlonale di capra anti-ACTH umano, purificato mediante cromatografia per affinità, e un anticorpo monoclonale anti-ACTH umano, sono specifici per regioni ben definite della molecola ACTH. Un anticorpo, biotilinato, è preparato per legarsi solo all'ACTH 34-39 della regione C-terminale. L'altro anticorpo è preparato per legarsi solo all'ACTH 1-24 della regione medio molecolare e del frammento N-terminale ed è coniugato con perossidasi di rafano [HRP].

Pozzetto rivestito di streptavidina - Anti-PTH biotilinato (34-39) -- ACTH -- Anti-ACTH coniugato HRP (1-24)

In questo saggio, i calibratori, i controlli o i campioni paziente vengono incubati contemporaneamente con un anticorpo marcato con enzima e con uno coniugato con biotina in un pozzetto per micropiastre rivestite di streptavidina. Al termine dell'incubazione del saggio, il micropozzetto viene lavato per eliminare i residui non legati e l'enzima legato alla fase solida viene incubato con il substrato (tetrametilbenzidina, TMB). In seguito per arrestare la reazione viene aggiunta una soluzione bloccante acida, che conferisce al liquido una colorazione gialla. L'intensità cromatica è direttamente proporzionale alla concentrazione di ACTH nel campione. Sulla base dei risultati ottenuti dai calibratori viene generata una curva di risposta alla dose di unità di assorbanza in relazione alla concentrazione. Le concentrazioni di ACTH presenti nei controlli e nei campioni paziente sono determinati direttamente da questa curva.

#### 5 COMPONENTI DEL KIT

Componenti del kit	Descrizione	Quantità
<b>RGT 1</b> = Reagente 1	Anticorpo ACTH biotilinato [anti-ACTH umano di capra purificato per affinità]	1 x 2,7 mL
<b>RGT 2</b> = Reagente 2	Anticorpo ACTH coniugato con perossidasi (enzima) [anti-ACTH umano monoclonale di topo]	1 x 2,7 mL
<b>RGT A</b> = Reagente A <i>ELISA</i>	Soluzione di lavaggio concentrata ELISA (fisiologica con tensioattivi)	1 x 30 mL
<b>RGT B</b> = Reagente B <i>ELISA</i>	Substrato TMB [tetrametilbenzidina]	1 x 15,5 mL
<b>SOLN</b> = Soluzione bloccante	Soluzione bloccante ELISA [1 N acido solforico]	1 x 20 mL
<b>PLA</b> = Micropiastre	Contenitore con strisce rivestite di streptavidina	12 strisce per 8 pozzetti
<b>CAL</b> = Calibratori A: 0 pg/mL B - F: le concentrazioni esatte sono riportate sull'etichetta delle provette	h-ACTH sintetico liofilizzato (tranne calibratore zero). Calibratore zero [soluzione BSA con siero equino] in forma liquida, pronto all'uso. Tutti gli altri calibratori: h-ACTH (1-39) sintetico in soluzione BSA con siero equino.	1 x 4 mL per calibratore zero 1 x 2 mL per altri calibratori
<b>CTRL</b> = Controlli 1 e 2 I valori esatti sono riportati sull'etichetta delle provette	Liofilizzati. 2 livelli. h-ACTH (1-39) sintetico in soluzione BSA con siero equino	1 x 2 mL per livello

##### 5.1 MATERIALI E STRUMENTAZIONE (NON IN DOTAZIONE)

- Lettore per micropiastre.
- Lavatore per micropiastre (il lavaggio manuale è consentito in assenza di un lavatore automatico).
- Pipette di precisione per 25, 200, 100 e 150 µL.
- Opzionale: distributore multicanale o a ripetizione per 25, 100 e 150 µL.
- Agitatori per micropiastre: DRG ha rilevato che, con gli agitatori di diametro sotto indicato, i kit di streptavidina manterranno una risposta ottimale alle seguenti impostazioni di velocità:

Agitatori per micropiastre	Diametro di agitazione	Impostazione di velocità
Orbitale	3 mm (0,1118 in)	600 ± 10 giri/minuto
	19 mm (0,75 in)	170 ± 10 giri/minuto
Lineare	2.5 mm (0,098 in)	170 ± 10 giri/minuto

## 6 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

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

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

## 7 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

La determinazione dell'ACTH deve essere effettuata su plasma EDTA.

Per analizzare il campione in duplicato, sono necessari 400 µL di plasma EDTA. Raccogliere il sangue intero in una provetta lavanda [EDTA]. Separare tempestivamente il siero o il plasma, preferibilmente in una centrifuga refrigerata, e conservare ad una temperatura pari o inferiore a -20 °C.

I campioni di plasma EDTA devono essere conservati a 2 °C - 8 °C per un massimo di 8 ore. I campioni di plasma EDTA congelati a -20 °C sono stabili per un massimo di 4 mesi.

## 8 PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE

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

1. Tutti i reagenti, tranne i calibratori non zero, i controlli e la soluzione di lavaggio concentrata, sono pronti per l'uso. Conservare tutti i reagenti a 2 °C - 8 °C.
2. Per tutti i calibratori non zero (calibratore B ~ F) e i controlli 1 e 2, ricostituire ciascuna provetta con 2 µL di acqua distillata o deionizzata e mescolare. Incubare la provetta per 10 minuti, quindi mescolare abbondantemente agitando delicatamente per inversione per completare la ricostituzione. **Dopo la ricostituzione, usare calibratori e controlli quanto prima. Dopo l'uso, congelare (-20 °C) al più presto i calibratori ed i controlli rimanenti.** I campioni standard e di controllo sono stabili a -20 °C per 6 settimane dopo la ricostituzione, con un massimo di 3 cicli di congelamento-scongelo, se trattati in base alle raccomandazioni riportate nella sezione "Note sulla procedura".
3. **Reagente A ELISA:** Soluzione di lavaggio concentrata: mescolare abbondantemente il contenuto della soluzione di lavaggio concentrata. In presenza di un precipitato nella soluzione di lavaggio concentrata, dovuto a conservazione a basse temperature (es. 4 °C), dissolvere ponendo la provetta in un bagno ad acqua o in un forno a 37 °C con agitatore. Aggiungere la soluzione di lavaggio concentrata (30 mL) a 570 mL di acqua distillata o deionizzata e mescolare. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 90 giorni se conservata a temperatura ambiente.

## 9 PROCEDURA DI ANALISI

1. Distribuire nel contenitore un numero sufficiente di **strisce rivestite di streptavidina** per eseguire tutti e sei (6) i calibratori per EPO, A ~ F tra i CALIBRATORI ACTH (la concentrazione esatta è indicata sull'etichetta della provetta), controlli e campioni paziente.  
Come minimo, lasciare liberi due pozzetti come "bianchi". Fare riferimento al passo 9 per la lettura finale della micropiastro.
2. Pipettare **200 µL** di calibratori, controlli e campioni nel pozzetto previsto. **Dopo l'uso, congelare (-20 °C) al più presto i calibratori ed i controlli rimanenti.**
3. Aggiungere o versare **25 µL** di reagente 1 (anticorpo biotilinato) in ciascun pozzetto contenente il calibratori, controlli e campioni.
4. Aggiungere o versare **25 µL** di reagente 2 (anticorpo marcato con enzima) nei medesimi pozzetti.

Coprire le micropiastre con una pellicola di alluminio o con una vaschetta per ripararle dalla luce. Posizionarle su un **aggitatore** alle impostazioni consigliate (vedere la sezione 5.1) per **4 ore ± 30 minuti** a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).

5. Aspirare completamente il liquido, quindi lavare/aspirare ogni pozzetto cinque (5) volte con la soluzione di lavaggio (preparata dal reagente A), mediante un lavatore automatico per micropiastre. Impostare il volume della soluzione di lavaggio in modo che in ciascun pozzetto vengano versati 0,35 mL.
6. Aggiungere o versare **150 µL** di **reagente B ELISA** (substrato TMB) in ogni pozzetto.
7. Coprire le micropiastre per ripararle dalla luce e posizionarle su un aggitatore alle impostazioni consigliate (vedere la sezione 5.1) per **30 ± 5 minuti** a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).
8. Aggiungere o versare **100 µL** di soluzione bloccante in ogni pozzetto. Mescolare delicatamente.
9. Leggere l'assorbanza della soluzione nei pozzetti entro 10 minuti, usando un lettore per micropiastre impostato su **450 nm**. Prima di leggere, accertarsi che entrambi i "pozzetti del bianco", come indicato al punto 1, siano riempiti con 250 µL di acqua distillata o deionizzata. Leggere la piastra con il lettore impostato a **405 nm** contro acqua distillata o deionizzata.

*Nota: la seconda lettura serve ad ampliare la validità analitica della curva di calibrazione al valore rappresentato dal calibratore con il livello massimo, pari a circa 500 pg/mL. Pertanto i campioni di pazienti con un livello ACTH > 150 pg/mL possono essere quantificati in relazione ad una curva di calibrazione, costituita dai valori compresi sino all'equivalente di concentrazione del calibratore più elevato, usando il valore 405 nm, lontano dalla lunghezza d'onda della massima assorbanza. In generale, i campioni paziente e di controllo dovrebbero essere letti usando il valore 450 nm per concentrazioni di ACTH sino a 150 pg/mL. Concentrazioni di ACTH superiori a 150 pg/mL devono essere interpolate con il valore 405 nm.*

10. Utilizzando i valori di assorbanza finali ottenuti nella fase precedente, costruire una curva di calibrazione mediante interpolazione con spline cubica, a 4 parametri logistici o punto-punto per quantificare la concentrazione di ACTH.

### 9.1 NOTE SULLA PROCEDURA

- L'ACTH 1-39 è una molecola molto instabile. Preparare quindi il saggio immediatamente dopo la ricostituzione o lo scongelamento di tutti i calibratori, controlli e campioni paziente.
- Si raccomanda di analizzare tutti i calibratori, controlli e campioni paziente in duplicato. Le unità di assorbanza media dei duplicati devono essere impiegate per la riduzione di dati e per il calcolo dei risultati.
- I campioni devono essere pipettati nel pozzetto con la minima quantità possibile di bolle d'aria. A tale fine, si raccomanda di eseguire il "pipettaggio inverso" descritto nelle istruzioni del produttore delle pipette.
- I campioni paziente con valori superiori al calibratore più elevato (calibratore F), pari a circa 500 pg/mL (la concentrazione esatta è indicata sull'etichetta della provetta), possono essere diluiti con il calibratore A (calibratore zero) e rianalizzati. Moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.
- I reagenti con numeri di partita diversi non devono essere scambiati.
- Eventualmente mescolare, in volumi uguali e in quantità sufficienti per l'analisi, il reagente 1 (anticorpo biotilinato) e il reagente 2 (anticorpo marcato con enzima) in un flacone pulito color ambra. Quindi distribuire 50 µL dell'anticorpo mescolato in ciascun pozzetto. Questo metodo alternativo sostituisce i passaggi (3) e (4) e va seguito dall'incubazione con aggitatore orbitale.
- Nella fase di mescolatura evitare di spruzzare i reagenti dai pozzetti, per evitare di pregiudicare la precisione e l'accuratezza dell'analisi.

## 10 CALCOLO DEI RISULTATI

### 10.1 Metodo manuale

- Per i valori pari a 450 nm, costruire una curva di risposta alla dose (curva di calibrazione) usando i primi cinque calibratori forniti (calibratori A, B, C, D, E). Per i valori pari a 405 nm, costruire una seconda curva di risposta alla dose, usando i tre calibratori con le concentrazioni più elevate (calibratori D, E, F).
- Assegnare la concentrazione per ogni calibratore indicata sulla provetta in pg/mL. Su carta a scala lineare, tracciare i dati dalla curva di calibrazione con la concentrazione sull'asse delle ascisse e il corrispondente valore di assorbanza sull'asse delle ordinate.
- Tracciare una linea retta tra 2 punti adiacenti. Questo algoritmo matematico è noto come calcolo "punto-punto". Ottenere la concentrazione del campione individuando l'unità di assorbanza sull'asse delle ordinate e il corrispondente valore di concentrazione sull'asse delle ascisse. I campioni paziente e di controllo devono essere letti sulla base del valore 450 nm per concentrazioni di ACTH sino a 150 pg/mL. Concentrazioni di ACTH superiori a 150 pg/mL devono essere interpolate con il valore 405 nm.

### 10.2 Metodo automatico

I programmi che utilizzano l'interpolazione con spline cubica, a 4 parametri logistici o punto-punto offrono generalmente un buon adattamento.

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

Pozzetto micropiastra	1° valore Unità di assorbanza	2° valore Unità di assorbanza	Media Unità di assorbanza	ACTH pg/mL	ACTH pg/mL – Risultato
Calibratore A	0,020	0,018	0,019		0
Calibratore B	0,077	0,074	0,076		5
Calibratore C	0,221	0,229	0,225		18
Calibratore D	0,624	0,692	0,685		55
Calibratore E	1,802	1,934	1,868		165
Controllo 1	0,417	0,398	0,408	33,5	33,5
Controllo 2	2,868	2,774	2,821	>150	*
Campione paziente 1	0,072	0,078	0,075	4,9	4,9
Campione paziente 2	0,185	0,177	0,181	14,0	14,0
Campione paziente 3	0,495	0,491	0,493	40,8	40,8
Campione paziente 4	2,090	2,122	2,106	>150	*

\* Poiché il valore della concentrazione è > 150 pg/mL, si raccomanda di utilizzare i dati ottenuti a 405 nm come indicato nei **Dati campione a 405 nm** nella tabella seguente.

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

Pozzetto micropiastra	1° valore Unità di assorbanza	2° valore Unità di assorbanza	Media Unità di assorbanza	ACTH pg/mL	ACTH pg/mL – Risultato
Calibratore A	0,011	0,008	0,0095		0
Calibratore D	0,032	0,032	0,032		55
Calibratore E	0,074	0,081	0,078		165
Calibratore F	1,838	1,817	1,828		500
Controllo 1	0,138	0,132	0,135	<150	¶
Controllo 2	0,921	0,894	0,908	256	256
Campione paziente 1	0,030	0,032	0,031	<150	¶
Campione paziente 2	0,068	0,062	0,065	<150	¶
Campione paziente 3	0,165	0,159	0,162	<150	¶
Campione paziente 4	0,663	0,667	0,670	188	188

¶ Per i campioni con un valore > 150 pg/mL, si raccomanda di utilizzare i dati ottenuti a 450 nm come indicato nei **Dati campione a 450 nm** nella prima tabella. Questo metodo fornisce risultati che garantiscono la sensibilità ottimale del saggio.

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

## 11 CONTROLLO QUALITÀ

Il plasma di controllo ed i pool di plasma devono essere analizzati con ciascuna seduta di calibratori e di campioni paziente. I risultati generati dall'analisi dei campioni di controllo devono essere valutati per garantirne l'accettabilità mediante metodi statistici idonei. Nei saggi nei quali uno o più valori dei campioni di controllo qualità sono al di fuori dei limiti accettabili, i risultati per il campione del paziente potrebbero non essere validi.

## 12 LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Il kit ACTH ELISA DRG non rivela un "effetto gancio ad alte dosi" con campioni combinati con 20.000 pg/mL di ACTH. Tuttavia, i campioni con livelli di ACTH superiori al calibratore più elevato devono essere diluiti e riesaminati per produrre valori corretti.

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

I campioni prelevati da pazienti abitualmente esposti a prodotti o siero animale possono contenere anticorpi eterofili e provocare risultati atipici. Questo saggio è stato formulato in modo da ridurre il rischio di un'interferenza di questo genere. È tuttavia possibile che si manifestino potenziali interazioni tra sieri rari e i componenti del test.

## 13 VALORI PREVISTI

I livelli di ACTH sono stati misurati mediante il test ACTH ELISA in cento trenta quattro (134) individui in condizioni apparentemente normali negli Stati Uniti. I valori ottenuti sono compresi tra 7,0 e 63 pg/mL.

Sulla base di test statistici di asimmetria e curtosi, la popolazione, una volta trasformata a livello logaritmico, segue la distribuzione normale o gaussiana. La media geometrica e  $\pm 2$  deviazioni standard calcolate sono comprese tra 6,17 e 58,2 pg/mL.

## 14 CARATTERISTICHE DELLA PROCEDURA

### 14.1 Sensibilità

La sensibilità, o limite di rilevabilità, di questo saggio è definita come singolo valore minimo distinguibile dallo zero a un limite di confidenza del 95%. Il test ACTH ELISA ha una sensibilità calcolata a 0,22 pg/mL

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

## 1 USO PREVISTO

El enzimoimmunoanálisis de corticotropina (ACTH) se utiliza para la determinación cuantitativa de corticotropina en el plasma humano. Este análisis se destina a uso diagnóstico *in vitro*.

## 2 RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La corticotropina u hormona adrenocorticotropa (ACTH) es una hormona péptida de 39 aminoácidos (MW=4500) secretada por la hipófisis para regular la producción de hormonas esteroides de la corteza adrenal. La secreción de corticotropina desde la adenohipófisis es controlada tanto por el mecanismo de control de retroinhibición clásico como por el sistema de control mediado por el estrés del SNC.<sup>1</sup> Diversos tipos de estrés o dolores percibidos en niveles más altos de la secreción modulada del cerebro de la hormona neurosecretora hipotalámica, la hormona liberadora de corticotropina (CRH), un péptido de 41 aminoácidos. La CRH estimula la secreción de corticotropina en la hipófisis. El segundo péptido que modula la secreción de corticotropina es la vasopresina (AVP). La secreción de AVP también es estimulada por el estrés y actúa con la CRH de manera sinérgica para aumentar la secreción de corticotropina en la circulación portal de la hipófisis. La corticotropina aumenta la síntesis y la liberación de todos los esteroides adrenales, aldosterona, cortisol y andrógenos adrenales. Es el modulador principal de cortisol, el glucocorticoide más importante en el hombre. A medida que aumenta el nivel de cortisol en sangre, la liberación de corticotropina se inhibe directamente a nivel de la hipófisis. Mediante este mismo mecanismo, la reducción de los niveles de cortisol da como resultado niveles elevados de corticotropina.<sup>2,3,4,5</sup>

La corticotropina biológicamente activa es el resultado de la segmentación enzimática de una gran molécula precursora, la proopiomelanocortina (POMC). Esta molécula contiene dentro de su estructura las secuencias de aminoácidos de la ACTH, la Pro-ACTH, la hormona estimuladora del melanocito  $\beta$ , la lipotropina, así como de la endorfina y las encefalinas. Debido a que la reacción en los inmunoanálisis es determinada por la estructura antigénica y no por la función biológica, el RIA habitual de ACTH reacciona con la POMC, la Pro-ACTH, la ACTH y con algunos fragmentos de la ACTH.<sup>5</sup>

Al igual que otras hormonas hipofisarias, la corticotropina es secretada de manera pulsátil. Estos pequeños pulsos se superponen en una fluctuación diurna característica de mayor amplitud. En personas sanas, la ACTH alcanza un pico a la mañana temprano (6:00 - 8:00 horas) y los niveles alcanzan los valores más bajos ya avanzado el día y al acercarse el período de sueño. Debido a este ritmo diurno, se acostumbra tomar muestras de corticotropina en plasma entre las 8:00 y las 10:00 de la mañana. Sin embargo, puede establecerse mejor la diferencia entre los pacientes que sufren la enfermedad de Cushing y las personas que no trabajando con muestras obtenidas durante la tarde (16:00 - 18:00 horas). En la enfermedad de Cushing y en síndromes de ACTH ectópicos, el patrón diurno de la secreción de corticotropina generalmente se encuentra ausente. El estrés también puede anular la variación diurna.

## 3 TRASCENDENCIA CLÍNICA

Los análisis de corticotropina en plasma son útiles en el diagnóstico diferencial de la enfermedad de Addison, la enfermedad de Cushing de la hipófisis, los tumores hipofisarios que producen ACTH autónoma (por ejemplo, el síndrome de Nelson), la insuficiencia adenohipofisaria con deficiencia de corticotropina y el síndrome de ACTH ectópico.<sup>5,6,7,8,9,10</sup>

El síndrome de Cushing es causado por los efectos de las acciones de un exceso de glucocorticoides. Todas las causas del síndrome de Cushing, a excepción de la medicación a base de glucocorticoides, están asociadas con un aumento de cortisol en orina de 24 horas. La causa más común del síndrome de Cushing es la hiperplasia adrenal bilateral, debido a la hipersecreción hipofisaria de corticotropina (enfermedad de Cushing) proveniente un adenoma hipofisario o hiperplasia corticotropa.<sup>5,6,7,8,9,10</sup> El diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Cushing es sustentado por: (1) supresión de concentraciones de cortisol y ACTH en plasma, por administración de alta dosis de dexametasona (2,0 mg cada 6h durante 8 días), (2) ausencia de ACTH y supresión de cortisol con baja dosis de dexametasona (0,5 mg cada 6h durante 8 días o 1 mg a las 23:30 horas), (3) una respuesta que supere los valores normales ante la estimulación con metirapona (metopirona) y niveles de ACTH normales o elevados en plasma.<sup>4</sup>

Cuando el síndrome de Cushing es ocasionado por una anomalía suprarrenal primaria (adenoma o carcinoma), la glándula suprarrenal actúa independientemente de la corticotropina y se suprime la secreción de corticotropina hipofisaria.<sup>5,6,7,8,9,10</sup> Por lo tanto, no hay respuesta ante la supresión de la dexametasona o la estimulación con metirapona. Este tipo de síndrome de Cushing se caracteriza por niveles de ACTH muy bajos o imposibles de detectar. En consecuencia, la medición de corticotropina en plasma es útil en el diagnóstico diferencial del síndrome de Cushing hipofisario. En pacientes con tumores suprarrenales, los niveles de ACTH son bajos. En pacientes con síndrome de ACTH ectópico se observan altos niveles de corticotropina. Los pacientes con hiperplasia suprarrenal bilateral tendrán niveles de ACTH demasiado elevados para su grado de hipersecretorismo; se debería suprimir la ACTH. No obstante, en la mayoría de los casos la concentración de ACTH estará dentro del intervalo normal.



La insuficiencia cortical suprarrenal o la producción de cortisol inadecuada puede deberse a la destrucción de la corteza suprarrenal o a anomalías de la hipófisis o el hipotálamo, lo cual puede generar una producción de liberación de ACTH inadecuada.<sup>5,6,7,8,9,10</sup> La insuficiencia cortical suprarrenal primaria, la enfermedad de Addison, se caracteriza por niveles de ACTH en plasma notablemente elevados y una falta de respuesta suprarrenal a la estimulación con ACTH exógena. La insuficiencia adenohipofisiaria con deficiencia de corticotropina, la cual es una insuficiencia cortical suprarrenal secundaria, se caracteriza por bajas concentraciones de ACTH y cortisol en plasma y una respuesta suprarrenal subnormal pero, por lo general, distintiva a la estimulación con ACTH sintética (Cortrosyn®). Si se requiere estrés hipoglucémico o estimulación con metirapona para el diagnóstico, las respuestas de cortisol y corticotropina no alcanzarán los valores normales.

Los tumores de la hipófisis que producen ACTH agresivos e invasivos, que aparecen antes o después de una adrenalectomía bilateral para la enfermedad de Cushing (el síndrome de Nelson), se caracterizan por el desarrollo de pigmentación "adisoniana", a menudo en un paciente adrenalectomizado que está sometido a una terapia adecuada de reemplazo de glucocorticoides. En estos pacientes, los niveles de corticotropina en plasma están elevados notablemente y no responden bien a la supresión de la dexametasona.

#### 4 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El inmunoanálisis para la detección de corticotropina (ACTH) es un enzimoimmunoanálisis [ELISA] para la medición de la cadena biológicamente activa de 39 aminoácidos de ACTH. Un anticuerpo policlonal de cabra a la corticotropina humana, purificado por cromatografía por afinidad, y un anticuerpo monoclonal de ratón a la corticotropina humana son específicos para regiones bien definidas de la molécula de ACTH. Un anticuerpo está preparado para enlazar sólo ACTH 34-39 C-terminal y este anticuerpo es biotilado. El otro anticuerpo está preparado para enlazar sólo ACTH 1-24 N-terminal y región media, estando el mismo etiquetado con peroxidasa de rábano [HRP] para detección.

Pocillo de estreptavidina - AntiACTH biotilada (34-39) -- ACTH intacta -- AntiACTH conjugada con HRP (1-24)
---

En este análisis, los calibradores, los controles o 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 ACTH en la muestra. Se genera una curva dosis-respuesta de la unidad de absorbencia frente a la concentración mediante la utilización de los resultados obtenidos de los calibradores. Las concentraciones de corticotropina presentes en los controles y las muestras de pacientes se determinan directamente a partir de esta curva.

**5 COMPONENTES DEL KIT**

Componentes del kit	Descripción	Cantidad
<b>RGT 1</b> = Reactivo 1	Anticuerpo de ACTH biotinilado [ACTH antihumana de cabra purificada por afinidad]	1 x 2,7 mL
<b>RGT 2</b> = Reactivo 2	Anticuerpo de ACTH etiquetado con peroxidasa (enzima) [ACTH antihumana monoclonal de ratón]	1 x 2,7 mL
<b>RGT A</b> = Reactivo A	Concentrado de lavado para ELISA [Salino con agente tensioactivo]	1 x 30 mL
<b>RGT B</b> = Reactivo B	Sustrato TMB [tetrametilbencidina]	1 x 15,5 mL
<b>SOLN</b> = Solución de parada	Solución de parada para ELISA [ácido sulfúrico 1 N]	1 x 20 mL
<b>PLA</b> = Microplaca	Un soporte con tiras recubiertas de estreptavidina.	12 tiras de 8 pocillos
<b>CAL</b> = Calibradores A 0 pg/mL B: C: Consulte las etiquetas D: del vial para obtener E: las concentracion F:	ACTH sintética liofilizada [excepto calibrador cero] Calibrador cero [solución serosa BSA/equina] en forma líquida, listo para usar. Todos los demás calibradores constan de ACTH (1-39) sintética en solución serosa BSA/equina	1 x 4 mL para el calibrador cero  1 x 2 mL para todos los demás calibradores
<b>CTRL</b> = Controles 1 y 2 Consulte las etiquetas del vial para obtener los intervalos exactos	Liofilizados. 2 niveles. ACTH (1-39) sintética en solución serosa BSA/equina.	1 x 2 mL por nivel

**5.1 MATERIAL Y EQUIPO REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO**

- Lector de microplacas.
- Lavadora de microplacas [si no se puede disponer de una lavadora, se podría aceptar el lavado manual].
- Pipetas de precisión para dosificar 25, 200, 100 y 150 µL.
- (Opcional): Un dosificador de canales múltiples o un dosificador de repetición para 25, 100 y 150 µL.
- Agitadores de microplaca: DRG 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 (0.1118 in)	600 ± 10 rpm
	19 mm (0.75 in)	170 ± 10 rpm
Lineal	2.5 mm (0.098 in)	170 ± 10 rpm

**6 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS**

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.

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.

**7 RECOPIACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS**

La determinación de corticotropina debe realizarse en plasma (EDTA). Para realizar un análisis de la muestra por duplicado, se requiere 400 µL de plasma (EDTA). Recolecte sangre completa en un tubo azul [EDTA]. El plasma debe separarse inmediatamente, preferentemente en una centrifuga refrigerada y almacenarse a -20 °C o menos. Las muestras de plasma (EDTA) pueden almacenarse hasta 8 horas a 2 °C - 8 °C. Las muestras de plasma (EDTA) congeladas a -20 °C permanecen estables por un máximo de 4 meses.

## 8 PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

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

1. Todos los reactivos, excepto los calibradores que no sean cero, los controles del kit y el concentrado de lavado, están listos para usar. Almacene todos los reactivos a 2 °C - 8 °C.
2. 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 el vial repose 10 minutos y luego mezcle por completo, invirtiendo con cuidado el envase para obtener la reconstitución total. **Utilice los calibradores y los controles lo antes posible luego de la reconstitución. Congele (a -20 °C) los calibradores y los controles restantes lo antes posible luego de utilizarlos.** Los estándares y los controles permanecen estables a -20 °C durante 6 semanas luego de la reconstitución, con un máximo de 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento al manipularse 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 concentrado de lavado 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.

## 9 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 ACTH, del Calibrador A al F de los CALIBRADORES de ACTH [la concentración exacta se indica en la etiqueta del vial], el plasma de control de calidad y las muestras de pacientes.
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 -20 °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.

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 5.1) durante **4 horas ± 30 minutos** a temperatura ambiente (22 °C - 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 microplacas 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.
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 5.1) durante **30 ± 5 minutos** a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).
8. Agregue o vierta **100 µL** de la solución de parada en cada uno de los pocillos. Mezcle suavemente.
9. Lea la absorbencia de la solución en los pocillos dentro de los 10 minutos utilizando un lector de microplacas establecido en **450 nm** contra 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 está destinada a extender la validez analítica de la curva de calibración hasta el valor representado por el calibrador más alto, que es aproximadamente de 500 – 500 pg/mL. Por lo tanto, las muestras de pacientes con ACTH >150 pg/mL pueden 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 absorbencia máxima. En general, las muestras de pacientes y controles deben leerse utilizando los 450 nm para concentraciones de ACTH hasta 150 pg/mL. Las concentraciones de ACTH superiores a 150 pg/mL deben interpolarse mediante la lectura de 405 nm.*

10. Con los valores de absorbencia finales obtenidos en el paso anterior, trace una curva de calibración mediante una interpolación punto a punto o una interpolación logística de 4 parámetros o de regla flexible cúbica para cuantificar la concentración de la ACTH.

## 9.1 NOTAS DE PROCEDIMIENTO

- La ACTH 1-39 es una molécula muy lábil. Prepare el análisis inmediatamente después de realizada la reconstitución o el descongelamiento de todos los calibradores, los controles y las muestras de pacientes.
- Se recomienda realizar los análisis de todos los calibradores, los controles y las muestras de pacientes por duplicado. Las unidades de absorbencia promedio de grupos duplicados deben utilizarse entonces para reducir datos y calcular resultados.
- Las muestras deben colocarse en pipetas y verterse en el pocillo con una mínima cantidad de burbujas de aire. Para lograrlo, se recomienda utilizar la técnica de "pipeta inversa" descrita en el folleto de los fabricantes de pipetas incluido en el paquete.
- Las muestras de pacientes con valores superiores al calibrador más alto (Calibrador F), que oscila entre 500 pg/mL (vea la concentración exacta en la etiqueta del vial), pueden diluirse con el Calibrador A (Calibrador cero) y volver a analizarse. Multiplique el resultado por el factor de dilución.
- 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. Luego utilice 50 µL del anticuerpo mezclado en cada pocillo. Este método alternativo debe reemplazar al Paso (3) y (4), seguido por la incubación con agitador orbitario.
- Al mezclar, evite salpicar los reactivos fuera de los pocillos. Esto afectará la precisión y la exactitud del análisis.

## 10 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

### 10.1 Método manual

1. Para las lecturas de 450 nm, construya un 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, trace una segunda curva dosis-respuesta utilizando los tres calibradores con las concentraciones más altas, es decir, los Calibradores D, E y F.
2. Asigne la concentración para cada calibrador indicada en el vial en pg/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 absorbencia 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 absorbencia en el eje Y y buscando el valor de concentración correspondiente en el eje X. Las muestras de pacientes y controles deben leerse utilizando los 450 nm para concentraciones de ACTH hasta los 150 pg/mL. Las concentraciones de ACTH superiores a 150 pg/mL deben interpolarse mediante la lectura de 405 nm.

### 10.2 Método automático

Los programas informáticos que utilizan la regla flexible cúbica o 4 PL [Logística de 4 parámetros] o punto a punto pueden resultar adecuados.

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

Pocillo de microplaca	Unidad de absorbencia de 1ª lectura	Unidad de absorbencia de 2ª lectura	Unidad de absorbencia promedio	ACTH en pg/mL	ACTH en pg/mL – Resultado a informar
Calibrador A	0,020	0,018	0,019		0
Calibrador B	0,077	0,074	0,076		5
Calibrador C	0,221	0,229	0,225		18
Calibrador D	0,624	0,692	0,685		55
Calibrador E	1,802	1,934	1,868		165
Control 1	0,417	0,398	0,408	33,5	33,5
Control 2	2,868	2,774	2,821	> 150	*
Muestra de paciente 1	0,072	0,078	0,075	4,9	4,9
Muestra de paciente 2	0,185	0,177	0,181	14,0	14,0
Muestra de paciente 3	0,495	0,491	0,493	40,8	40,8
Muestra de paciente 4	2,090	2,122	2,106	> 150	*

\* Debido a que la lectura de la concentración es > 150 pg/mL, se recomienda utilizar los datos obtenidos en 405 nm, como se muestra en los **Datos de muestra a 405 nm** en la tabla incluida a continuación.

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

Pocillo de microplaca	Unidad de absorbencia de 1ª lectura	Unidad de absorbencia de 2ª lectura	Unidad de absorbencia promedio	ACTH en pg/mL	ACTH en pg/mL – Resultado a informar
Calibrador A	0,011	0,008	0,0095		0
Calibrador D	0,032	0,032	0,032		55
Calibrador E	0,074	0,081	0,078		165
Calibrador F	1,838	1,817	1,828		500
Control 1	0,138	0,132	0,135	< 150	¶
Control 2	0,921	0,894	0,908	256	256
Muestra de paciente 1	0,030	0,032	0,031	< 150	¶
Muestra de paciente 2	0,068	0,062	0,065	< 150	¶
Muestra de paciente 3	0,165	0,159	0,162	< 150	¶
Muestra de paciente 4	0,663	0,677	0,670	188	188

¶ Para las muestras con una lectura < 150 pg/mL, se recomienda utilizar los datos obtenidos en 450 nm, como se muestra en los **Datos de muestra a 450 nm** en la tabla incluida a continuación. 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.*

## 11 CONTROL DE CALIDAD

El plasma de control o los grupos de plasma deben analizarse con cada ejecución de los calibradores y las muestras de paciente. Los resultados generados a partir del análisis de las muestras de control deben evaluarse para su aceptación utilizando los métodos estadísticos adecuados. Es posible que, en análisis con uno o más valores de muestra de control de calidad que se encuentren fuera de los límites aceptables, los resultados de la muestra del paciente no sean válidos.

## 12 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El kit ELISA para ACTH no ha exhibido ningún “efecto gancho de alta dosis” con muestras que contenían 20.000 pg/mL de ACTH. Sin embargo, las muestras con niveles de ACTH mayores que el calibrador más alto deben diluirse y volver a analizarse para obtener los valores correctos.

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

Las muestras de pacientes habitualmente expuestos a animales o a productos de suero animal pueden contener anticuerpos heterófilos que produzcan resultados atípicos. Este ensayo se ha formulado para mitigar el riesgo de este tipo de interferencia. Sin embargo, pueden producirse posibles interacciones entre sueros poco comunes y los componentes de la prueba.

## 13 VALORES PREVISTOS

Los niveles de ACTH se midieron en ciento treinta cuatro (134) personas aparentemente normales en EE.UU. con la Prueba ELISA para ACTH. Los valores obtenidos oscilaron entre 7,0 y 63 pg/mL.

Según las pruebas estadísticas sobre asimetría y curtosis, la población sigue la distribución normal o gaussiana. Las desviaciones estándar de la media geométrica de  $\pm 2$  se calcularon entre 6,17 y 58,2 pg/mL.

## 14 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### 14.1 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 ACTH de tiene una sensibilidad calculada de 0,22 pg/mL.

Consultar el manual de usuario en inglés.

**15 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA**

1. Ryan, WG: Endocrine Disorders – A Pathophysiologic Approach, 2<sup>nd</sup> Edition Year Book Medical Publishers, Inc. 1980.
2. Watts, N.B., J.H. Keffer: Practical Endocrine Diagnosis, Third Edition, Lea and Febioer, 1982.
3. Ganong, WF. Alpert LC, Lee TC: ACTH and the Regulation of Adrenocorticol Secreton, N. Engl. J. Med. 290 : 1006, 1974.
4. Tepperman, J: Metabolic and Endocrine Physiology, 4th Edition, Year Book Medical Publishers, Inc., 1981.
5. Odell, W.D., R. Horton, M.R. Pandian, J. Wong: The Use of ACTH and Cortisol Assays in the Diagnosis of Endocrine Disorders. Nichols Institute Publication, 1989.
6. Radioimmunoassay Manual, Edited by A.L. Nichols and J.C. Nelson, 4th Edition Nichols Institute, 1977.
7. Gold, E.M.: The Cushing's Syndromes: Changing Views of Diagnosis and Treatment. Ann Intern. Med. 90:829, 1979.
8. Plasma Cortisol, RIA for Physicians, Edited by J.C. Travis, 1:8, Scientific Newsletter, Inc. 1976.
9. Krieger, D.T.: Physiopathology of Cushing's Disease, Endocrine Review 4:22-43, 1983.
10. Krieger, D.T., A.S. Liotta, T. Suda, A Goodgold, and E. Condon: Human Plasma Immunoreactive Lipotropin and Adrenocorticotropin in Normal Subjects and in Patients with Pituitary-Adrenal Disease, J. Clin. Endocrinol Metab. 48:566-571, 1979.

## 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
<i>Distributed by</i>	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