



IVD

CE

# ACTH-IRMA

*KIP0061*

---

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

# History

---

## Summary of change:

<b>Current Version:</b> <b>230123</b>
New logo

Read entire protocol before use.

## ACTH-IRMA

### I. INTENDED USE

Immunoradiometric assay kit for the *in vitro* quantitative measurement of human Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) in EDTA plasma.

### II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource ACTH-IRMA Kit
- B. **Catalog number :** KIP0061: 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**For technical assistance or ordering information contact :**  
**Tel : +32 (0)10 84.99.11      Fax : +32 (0)10 84.99.91**

### III. CLINICAL BACKGROUND

#### A. Biological Activity

Adrenocorticotrophic hormone (ACTH or corticotrophin) is a polypeptide hormone synthesised (from POMC, pro-opiomelanocortin) and secreted from corticotropes in the anterior lobe of the pituitary gland in response to the hormone corticotrophin-releasing hormone (CRH) released by the hypothalamus. It consists of 39 amino acids with a molecular weight of 4540 Da.

ACTH regulates steroid synthesis by the adrenal cortex. ACTH stimulates the secretion of cortisol from the adrenal glands. Cortisol and other glucocorticoids increase glucose production, inhibit protein synthesis and increase protein breakdown, stimulate lipolysis, and affect immunological and inflammatory responses. Cortisol induces thymus involution which is a decline in normal thymus function that in part accounts for its ability to decrease immune system response. Glucocorticoids help maintain blood pressure and form an essential component of the body's response to stress. ACTH secretion is regulated by corticotrophin-releasing hormone (CRH) and vasopressin (ADH). Cortisol feeds back to the pituitary and hypothalamus to suppress levels of ACTH and CRH. Under basal (non-stress) conditions, cortisol is secreted with a pronounced circadian rhythm, with higher levels early in the morning and low levels late in the evening. Under stressful conditions, the circadian variation is blunted.

Non-adrenal gland mediated effects : ACTH stimulates the release of MSH (melanotropic hormone) and GH (growth hormone), increases lipolysis in fat cells (adipocytes), and induces neurological effects (such as stretching and yawning). Much of this is related to its origin from POMC. Lipolysis by ACTH is much weaker than that of lipotropin (LPH). ACTH is a precursor of  $\alpha$ -MSH.

In the adrenal cortex, there are two types of ACTH receptors, one with a  $KD = 1nM$ , but only about 60 per cell while the other has a  $KD = 300nM$ , but with about 600,000 per cell. The presence of high and low affinity receptors for ACTH means that tissues are sensitive not only to the presence of ACTH, but to its concentration.

#### B. Clinical Application

Too much ACTH can result in overproduction of cortisol which can cause Cushing's syndrome. Too much ACTH can be caused by benign pituitary adenoma. Other causes of Cushing's syndrome (too much cortisol) include ectopic production of ACTH as encountered in some lung tumors and benign and malignant adrenal tumors. The most common cause of Cushing's syndrome is exogenous ingestion of glucocorticoids.

Symptoms of Cushing's syndrome include truncal obesity, extremity wasting, moon face, buffalo hump, thinning skin, easy bruising, muscular weakness, hypertension, atherosclerosis, congestive heart failure, edema, menstrual irregularities, psychological disturbances, osteoporosis, increased infections, and poor wound healing.


Reduced secretion of ACTH by the pituitary gland is called secondary adrenal insufficiency. Tertiary adrenal insufficiency is caused by failure of the hypothalamus to produce corticotrophin-releasing hormone (CRH) while primary adrenal insufficiency is defined as loss of adrenocortical hormones due to destruction or impairment of the adrenal cortex. All patients with adrenal insufficiency show weight loss. Secondary and tertiary adrenal insufficiency is in part diagnosed by ACTH (Cortrosyn) injection to look for stimulation of cortisol production.

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIASource ACTH-IRMA is a two-step immunoradiometric assay based on coated-tube separation. It allows the determination of intact human adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in EDTA plasma. Monoclonal antibodies specific to the 1-24 ACTH fragment (N-terminal fragment) are attached to the lower and inner surface of the plastic tubes. Calibrators or samples are added to the tubes. After 2 hour incubation, washing removes the occasional excess of antigen, mid-regional and C-terminal fragments.

<sup>125</sup>I labelled polyclonal antibodies specific to the 24-39 ACTH fragment (C-terminal fragment) are added. After 1 hour incubation and washing the remaining radioactivity bound to the tube reflects the intact ACTH concentration.

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	Quantity 96 tests	Reconstitution			
 Tubes coated with anti ACTH ( monoclonal antibodies)	2 x 48	Ready for use			
<table border="1" data-bbox="97 689 304 734"> <tr> <td>Ab</td> <td>125I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Anti-ACTH- <sup>125</sup> I (polyclonal antibodies) in Phosphate Buffer with bovine albumin and sodium azide (<0.1%)	Ab	125I	CONC	1 vial 0.650 ml 890 kBq	Dilute 21x with Tracer Buffer (see section VII. C)
Ab	125I	CONC			
<table border="1" data-bbox="97 880 288 925"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tracer Buffer: Borate Buffer with sheep serum, EDTA and azide (<0.1%)	TRACER	BUF	1 vial 11 ml	Ready for use	
TRACER	BUF				
<table border="1" data-bbox="124 1025 268 1070"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Zero Calibrator in human plasma with thymol and benzamidin	CAL	0	1 vial lyophil.	Add 5 ml reconstitution solution	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="124 1137 268 1182"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrators 1-6 in human plasma with thymol and benzamidin (see exact values on vial labels)	CAL	N	6 vials lyophil.	Add 1 ml reconstitution solution	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="97 1272 288 1317"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Reconstitution solution : Borate Buffer with EDTA and sodium azide (< 0.1%)	REC	SOLN	1 vial 15 ml	Ready for use	
REC	SOLN				
<table border="1" data-bbox="97 1406 288 1451"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Incubation Buffer: Phosphate Buffer with bovine albumin and azide (<0.1%)	INC	BUF	1 vial 6 ml	Ready for use	
INC	BUF				
<table border="1" data-bbox="97 1552 323 1597"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Wash solution (Tween 20-NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 40 ml	Dilute 20x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="97 1664 288 1709"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controls 1 and 2 in human plasma with thymol	CONTROL	N	2 vials lyophil.	Add 1 ml reconstitution solution	
CONTROL	N				

Note: 1. Use the zero calibrator for sera dilutions.  
2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 1 pg of NIBSS 74/555

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml and 3 ml. (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Tube shaker (400 rpm)
- 5 ml automatic syringe (Comwall type) for washing

- Aspiration system (optional).
- Any gamma counter capable of measuring <sup>125</sup>I may be used (minimal yield 70%).

#### VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators** : Reconstitute the zero calibrator with 5 ml reconstitution solution and the other calibrators with 1 ml reconstitution solution.
- Controls** : Reconstitute the controls with 1 ml reconstitution solution.
- Tracer** : Prepare an adequate volume of Tracer solution by adding 50 µl of Anti-ACTH-<sup>125</sup>I to 1 ml of Tracer Buffer. Use a vortex to homogenize.
- Working Wash solution** : Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 19 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (20x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

#### VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- The calibrators and controls are very unstable, use them immediately after reconstitution, freeze immediately in aliquots and keep them at -20°C for maximum 7 weeks. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at -20°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

#### IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- EDTA plasma should be used and the usual precautions for venipuncture should be observed.
- Specimens should be collected and be placed on ice immediately or drawn into previously chilled tubes. Immediately separate in a refrigerated centrifuge (2-8°C). If not assayed immediately (within one hour), remove the plasma supernatant to the appropriately labelled plastic storage vessel, and freeze at -70°C or colder for up to 45 days.
- Specimens may not remain stable when stored at -20°C.
- Do not use hemolyzed or lipemic specimens.

#### X. PROCEDURE

- Handling notes**  
Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use.  
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.  
High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.  
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
- Procedure**
  - Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For determination of total counts, label 2 normal tubes.
  - Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 200 µl of each into the respective tubes.
  - Dispense 50 µl Incubation Buffer in each tube except those for total counts.
  - Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
  - Incubate for 2 hour at room temperature on a tube shaker (400 rpm).
  - Aspirate the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
  - Wash the tubes with 2 ml Wash Solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash Solution.
  - Aspirate the content of each tube (except total counts).
  - Wash again the tubes with 2 ml Wash Solution (except total counts) and aspirate.
  - After the last washing, let the tubes standing upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
  - Dispense 100 µl of anti-ACTH-<sup>125</sup>I tracer into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
  - Shake the rack containing the tubes gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
  - Incubate for 1 hour at room temperature on a tube shaker (400 rpm).

14. Aspirate the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated-tube in order to remove all the liquid.
15. Wash the tubes with 2 ml Wash Solution (except total counts). Avoid foaming during the addition of the Working Wash Solution.
16. Aspirate the content of each tube (except total counts).
17. Wash again the tubes with 2 ml Wash Solution (except total counts) and aspirate.
18. After the last washing, let the tubes standing upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
19. Count the tubes in a gamma counter for 60 seconds.

## XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. Plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of ACTH (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
4. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

## XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

ACTH-IRMA		cpm	B/T (%)
Total count		273476	100
Calibrator	0.0 pg/ml	418	0.2
	9.6 pg/ml	1580	0.6
	31.2 pg/ml	3836	1.4
	97.2 pg/ml	10839	4.0
	295.4 pg/ml	27691	10.1
	1006.4 pg/ml	64156	23.5
	1931.9 pg/ml	93486	34.2

## XIII. PERFORMANCE

### A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration three standard deviations above the average counts at zero binding, was 1.16 pg/ml.

### B. Specificity

Possible interfering peptides were added to a low and to a high ACTH level plasma EDTA. The apparent ACTH response was measured.

Added analyte to a low ACTH level EDTA plasma	Observed ACTH level (pg/ml)	Added analyte to a medium ACTH level EDTA plasma	Observed ACTH level (pg/ml)
Nothing	0.9	Nothing	34.5
ACTH 1-17 fragment 100000 pg/ml	0.8	ACTH 1-17 fragment 100000 pg/ml	25.0
ACTH 18-39 fragment 100000 pg/ml	7.1	ACTH 18-39 fragment 100000 pg/ml	33.5
Rat ACTH 1000 pg/ml	364.7	Rat ACTH 1000 pg/ml	450.0
αMSH 100000 pg/ml	1.8	αMSH 100000 pg/ml	31.6
βMSH 100000 pg/ml	0.9	βMSH 100000 pg/ml	33.0
βEndorphin 100000 pg/ml	1.1	βEndorphin 100000 pg/ml	32.8

This demonstrates that the ACTH-IRMA does not cross react with ACTH fragments, αMSH, βMSH and βEndorphin but cross react with Rat ACTH at 39%.

## C. Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	19	17.5 ± 1.1	6.4	D	15	29.6 ± 1.4	4.8
B	20	69.3 ± 2.1	3.0	E	15	121.9 ± 7.5	6.2
C	20	386.7 ± 15.1	3.9				

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

## D. Accuracy

RECOVERY TEST			
Sample	Added ACTH (pg/ml)	Recovered ACTH (pg/ml)	Recovery (%)
1	1100.0	1128.0	102.5
	550.0	552.5	100.5
	275.0	273.8	99.6
	137.5	149.0	108.4

DILUTION TEST			
Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)
1	1/1	-	499.4
	1/2	249.7	226.2
	1/4	124.8	111.0
	1/8	62.4	57.5
	1/16	31.2	27.8
	1/32	15.6	16.1
	1/64	7.8	7.4
2	1/1	-	348.4
	1/2	174.2	167.5
	1/4	87.1	89.9
	1/8	43.6	40.0
	1/16	21.8	20.6
	1/32	10.9	10.4
	1/64	5.4	5.7

Samples were diluted with zero calibrator.

### E. Time Delay

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 30 minutes after the calibrator has been added to coated tubes.

	0'	10'	20'	30'
C1	546.1	563.9	563.4	568.9
C2	86.6	88.7	89.0	85.9
C3	44.4	44.4	42.9	43.2
C4	122.4	123.0	122.6	121.0

### F. Hook effect

A plasma EDTA sample with an ACTH concentration of 69000 pg/ml gives a signal above the highest calibrator concentration.

## XIV. LIMITATIONS

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with in vitro immunoassays. Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophilic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies. If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

## XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

## XVI. REFERENCE INTERVALS

The values provided below are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values. The range of ACTH levels in 47 normal patients, expressed as 5% to 95% percentiles, was 9.6 to 49.7 pg/ml.

## XVII. PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains <sup>125</sup>I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and  $\gamma$  (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

## XVIII. BIBLIOGRAPHY

1. SMITH IA, FUNDER JW.  
**Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.**  
Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.
2. LUMPKIN MD.  
**The regulation of ACTH secretion by IL-1.**  
Science 1987; 238:452-454.
3. MILLER WL.  
**Molecular biology of steroid hormones synthesis.**  
Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.
4. FRASER NL.  
**Storage of biological sample.**  
NASA Cr- 1967; 781.
5. RAFF H.  
**Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.
6. GOVERDE HJ.  
**Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson's syndrome.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.

7. GOVERDE HJ.  
**The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.**  
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.
8. LAMBERT A.  
**On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.**  
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.
9. KRIEGER DT.  
**Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.
10. KRIEGER DT.  
**Physiopathology of Cushing's disease.**  
Endocrine Review. 1983; 4:22-43.
11. GANONG WF.  
**ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.**  
N Engl J Med. 1974; 290-1006.
12. PRIMUS FJ, KELLEY EA, HANSEN HJ, GOLDENBERG DM.  
**Sandwich – Type Immunoassay of Carcinoembryonic Antigen in Patients Receiving Murine Monoclonal Antibodies for Diagnosis and Therapy.**  
Clin Chem 1988;34:261
13. SCHROFF RW, FOON KA, BEATTY SM, OLDHAM RK, MORGAN AC JR  
**Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy.**  
Cancer Res 1985;45:879-85
14. BOSCATO LM, STUART MC.  
**Heterophilic Antibodies: A problem for All Immunoassays**  
Clin Chem 1988; 34(1):27-33

**XIX. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

	TOTAL COUNTS μl	CALIBRATORS μl	SAMPLE(S) CONTROLS μl
Calibrators (0-6)	-	200	-
Samples, controls	-	-	200
Incubation Buffer	-	50	50
Incubation	2 hour at room temperature with shaking at 400 rpm		
Separation	-	aspirate	
Washing solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate	
Washing solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate	
Tracer	100	100	100
Incubation	1 hour at room temperature with shaking at 400 rpm		
Separation	-	aspirate	
Washing solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate	
Washing solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

# ACTH-IRMA

## I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunométrique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'hormone adrénocorticotrope humaine (ACTH) dans le plasma prélevé sur EDTA.

## II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIASource ACTH-IRMA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP0061 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**Pour une assistance technique ou une information sur une commande :**

**Tel : +32 (0)10 84.99.11**

**Fax : +32 (0)10 84.99.91**

## III. CONTEXTE CLINIQUE

### A. Activités biologiques

L'hormone adrénocorticotrope (ACTH ou corticotrophine ou encore corticostimuline) est une hormone polypeptidique synthétisée (à partir de POMC, pro-opiomélanocortine) et sécrétée par les corticotropes du lobe antérieur de l'hypophyse en réponse à la substance libératrice de la corticostimuline (CRH) libérée par l'hypothalamus. Elle est constituée de 39 acides aminés et possède un poids moléculaire de 4540 Da.

L'ACTH régule la synthèse des stéroïdes par le cortex surrénalien. L'ACTH stimule la sécrétion du cortisol par les glandes surrénales. Le cortisol et d'autres glucocorticoïdes augmentent la production de glucose, inhibent la synthèse protéique et augmentent le catabolisme protéique, stimulent la lipolyse et détériorent les réponses immunologiques et inflammatoires. Le cortisol induit une involution thymique et donc une baisse de la fonction thymique normale, ce qui explique en partie sa capacité à diminuer la réponse du système immunitaire. Les glucocorticoïdes aident à maintenir la pression sanguine et sont un composant essentiel de la réponse du corps au stress. La sécrétion d'ACTH est régulée par la substance libératrice de la corticostimuline (CRH) et la vasopressine (ADH). Le cortisol agit en retour sur l'hypophyse et l'hypothalamus pour réprimer les taux d'ACTH et d'ADH. Dans des conditions de base (pas de stress), la sécrétion du cortisol montre un rythme circadien prononcé avec des taux plus élevés tôt le matin et des taux bas tard le soir. Dans des conditions de stress, la variation circadienne est éteinte.

Effets obtenus par la médiation de l'ACTH en dehors de la glande surrénale: l'ACTH stimule la libération de la MSH (hormone mélanotrope) et de la GH (hormone de croissance), augmente la lipolyse dans les cellules adipeuses (adipocytes) et induit des effets neurologiques (comme l'étirement et les bâillements). La plupart de ces effets sont liés à ceux de la POMC. La lipolyse provoquée par l'ACTH est plus faible que celle induite par la lipotropine (LPH). L'ACTH est le précurseur de l' $\alpha$ -MSH.

Le cortex surrénalien comporte deux types de récepteurs à l'ACTH: l'un avec un  $KD = 1$  nM, mais il n'y en a qu'environ 60 par cellules, l'autre avec un  $KD = 300$  nM, mais il y en a environ 600.000 par cellule. La présence de récepteurs à haute et à faible affinité pour l'ACTH permet aux tissus d'être sensibles non seulement à la présence de l'ACTH, mais aussi à sa concentration.

### B. Application clinique

Un excès d'ACTH peut entraîner une surproduction de cortisol qui, à son tour, peut provoquer un syndrome de Cushing. Un excès d'ACTH peut être provoqué par un adénome hypophysaire bénin. Les autres causes du syndrome de Cushing (trop de cortisol) incluent la production ectopique d'ACTH, comme on la rencontre dans certains cancers du poumon, et des tumeurs surrénales bénignes et malignes. La cause la plus fréquente du syndrome de Cushing est une ingestion exogène de glucocorticoïdes.

Les symptômes du syndrome de Cushing comprennent l'obésité du tronc, un dépérissement extrême, une face en forme de lune, la bosse de bison, un amaigrissement de la peau, une proposition aux bleus, une faiblesse musculaire, une hypertension, l'athérosclérose, une insuffisance cardiaque congestive, des œdèmes, des menstruations irrégulières, des troubles psychologiques, l'ostéoporose, une augmentation des infections et une cicatrisation médiocre.


Une diminution de la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse est appelée insuffisance surrénale secondaire. L'insuffisance surrénale tertiaire est provoquée par l'incapacité de l'hypothalamus à produire la substance libératrice de la corticostimuline (CRH) alors que l'insuffisance surrénale primaire est définie comme une perte des hormones adrénocorticales due à la destruction ou à la déficience du cortex surrénalien. Tous les patients souffrant d'une insuffisance surrénale présentent une perte de poids. Les insuffisances surrénales secondaire et tertiaire sont en partie diagnostiquées par l'injection d'ACTH (Cortrosyn) et le suivi de la stimulation de la production de cortisone.

#### IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse DIAsource ACTH-Irma est une trousse de dosage radio-immunométrique en deux étapes basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Elle permet la détermination de l'hormone adrénocorticotrope humaine intacte (ACTH) dans le plasma prélevé sur EDTA. Des anticorps monoclonaux spécifiques du fragment 1-24 de l'ACTH (fragment N-terminal) sont fixés dans le fond et sur la surface intérieure de tubes en plastique. Les calibrateurs et les échantillons sont ajoutés aux tubes. Après 2 heures d'incubation, le lavage enlève l'excès éventuel d'antigène, les fragments médians et les fragments C-terminaux.

On ajoute des anticorps polyclonaux marqués à l'<sup>125</sup>I spécifiques du fragment 24-29 de l'ACTH (fragment C-terminal). Après 1 heure d'incubation et un lavage, la radioactivité restante liée au tube reflète la concentration en ACTH intacte.

#### V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	Trousse de 96 analyses	Reconstitution			
 Tubes recouverts avec l'anti ACTH (anticorps monoclonaux)	2 x 48	Prêt à l'emploi			
<table border="1" data-bbox="92 750 300 795"><tr><td>Ab</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table> Anti-ACTH- <sup>125</sup> I (anticorps polyclonaux) dans un tampon Phosphate avec de l'albumine bovine et de l'azoture (<0.1%)	Ab	125I	CONC	1 flacon 0,650 ml 890 kBq	Diluer 21 x avec du tampon traceur (voir section VII.C).
Ab	125I	CONC			
<table border="1" data-bbox="92 884 268 929"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Tampon traceur: Tampon borate avec sérum de mouton, EDTA et azoture (<0.1%)	TRACER	BUF	1 flacon 11 ml	Prêt à l'emploi	
TRACER	BUF				
<table border="1" data-bbox="108 1019 236 1064"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrateur zéro dans du plasma humain contenant du thymol et benzamidine	CAL	0	1 flacon lyophilisé	Ajouter 5 ml de la solution de reconstitution	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="108 1131 236 1176"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateur N = 1 à 6 (cf. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du plasma humain contenant du thymol et benzamidine	CAL	N	6 flacons lyophilisés	Ajouter 1 ml de la solution de reconstitution	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="92 1276 268 1321"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Solution de reconstitution : Tampon borate avec EDTA et azoture de sodium (< 0.1%)	REC	SOLN	1 flacon 15 ml	Prêt à l'emploi	
REC	SOLN				
<table border="1" data-bbox="156 1400 331 1444"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Tampon d'incubation : tampon phosphate contenant de l'albumine bovine et de l'azoture (<0.1%)	INC	BUF	1 flacon 6 ml	Prêt à l'emploi	
INC	BUF				
<table border="1" data-bbox="92 1523 268 1568"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de Lavage (Tween - NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 40 ml	Diluer 20 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="92 1635 252 1680"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain et du thymol	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Ajouter 1 ml de la solution de reconstitution	
CONTROL	N				

Note: 1. Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.  
2. 1 pg de la préparation du calibrateur est équivalent à 1 pg NIBSC 74/555.

#### VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml et 3 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Agitateur de tubes (400 rpm)
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d'aspiration (optionnel)

- Tout compteur gamma capable de mesurer l'<sup>125</sup>I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

#### VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs** : Reconstituer le calibrateur zéro avec 5,0 ml de la solution de reconstitution et les calibrateurs 1 à 6 avec 1,0 ml.
- Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 1,0 ml de la solution de reconstitution.
- Traceur** : Préparer un volume adéquat de solution de traceur en ajoutant 50 µl d'anti-ACTH-<sup>125</sup>I à 1 ml de tampon traceur. Utiliser un vortex pour homogénéiser.
- Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 19 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (20x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

#### VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Les calibrateurs et les contrôles sont très instables. Utiliser les immédiatement après leur reconstitution. Congeler immédiatement en aliquotes et conserver les à -20°C pendant 7 semaines au maximum. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé à -20°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

#### IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Il faut utiliser du plasma sur EDTA. Les précautions habituelles doivent être observées lors de la ponction veineuse.
- Les échantillons doivent être prélevés et placés immédiatement sur de la glace ou être prélevés dans des tubes refroidis auparavant. Séparer immédiatement dans une centrifugeuse réfrigérée (2-8°C). Si l'échantillon n'est pas immédiatement analysé (endéans l'heure), transférer le plasma sur un récipient de stockage en plastique convenablement étiqueté et surgeler à -70°C, ou moins, jusqu'à 45 jours.
- Les échantillons ne restent pas stables lorsqu'ils sont stockés à -20°C.
- Ne pas utiliser des échantillons hémolysés ou lipémiques.

#### X. MODE OPERATOIRE

##### A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.

Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

##### B. Mode opératoire

- Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d'anticorps.
- Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 200 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
- Ajouter 50 µL de tampon d'incubation dans chaque tube à l'exception des ceux servant au comptage total.
- Secouer gentiment à la main le portoir contenant les tubes pour libérer toutes les bulles d'air piégées.
- Incuber pendant 120 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).
- Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour

- éliminer toute trace de liquide.
7. Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
  8. Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
  9. Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer.
  10. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
  11. Distribuer 100 µl de traceur dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
  12. Secouer gentiment à la main le portoir contenant les tubes pour libérer toutes les bulles d'air piégées.
  13. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).
  14. Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
  15. Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
  16. Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
  17. Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer.
  18. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
  19. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

#### XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
2. Tracer les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en ACTH (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.
3. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
4. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

#### XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

ACTH-IRMA		cpm	B/T (%)
Activité totale		273476	100
Calibrateur	0,0 pg/ml	418	0,2
	9,6 pg/ml	1580	0,6
	31,2 pg/ml	3836	1,4
	97,2 pg/ml	10839	4,0
	295,4 pg/ml	27691	10,1
	1006,4 pg/ml	64156	23,5
	1931,9 pg/ml	93486	34,2

#### XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

##### A. Sensibilité

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme étant la concentration apparente se trouvant à trois déviations standard au-dessus de la moyenne des comptages du zéro de liaison, était de 1,16 pg/ml.

##### B. Spécificité

Les peptides pouvant interférer ont été ajoutés à un plasma sur EDTA avec une teneur en ACTH basse et élevée. On a mesuré la réponse apparente de l'ACTH.

Analyte ajouté à un plasma sur EDTA avec un niveau d'ACTH bas	Niveau d'ACTH observé (pg/ml)	Analyte ajouté à un plasma sur EDTA avec un niveau d'ACTH moyen	Niveau d'ACTH observé (pg/ml)
Rien	0,9	Rien	34,5
ACTH, fragment 1-17 100000 pg/ml	0,8	ACTH, fragment 1-17 100000 pg/ml	25,0
ACTH, fragment 18-39 100000 pg/ml	7,1	ACTH, fragment 18-39 100000 pg/ml	33,5
ACTH de rat 1000 pg/ml	364,7	ACTH de rat 1000 pg/ml	450,0
αMSH 100000 pg/ml	1,8	αMSH 100000 pg/ml	31,6
βMSH 100000 pg/ml	0,9	βMSH 100000 pg/ml	33,0
βEndorphine 100000 pg/ml	1,1	βEndorphine 100000 pg/ml	32,8

Cela démontre que l'ACTH-IRMA ne réagit pas de manière croisée avec les fragments d'ACTH, l'αMSH, la βMSH et la βendorphine, mais réagit de manière croisée avec l'ACTH de rat à 39%.

##### C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Sérum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	19	17,5 ± 1,1	6,4	D	15	29,6 ± 1,4	4,8
B	20	69,3 ± 2,1	3,0	E	15	121,9 ± 7,5	6,2
C	20	386,7 ± 15,1	3,9				

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

##### D. Exactitude

###### TEST DE RECUPERATION

ACTH ajoutée (pg/ml)	ACTH récupérée (pg/ml)	Récupération (%)
1100,0	1128,0	102,5
550,0	552,5	100,5
275,0	273,8	99,6
137,5	149,0	108,4

###### TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,4
2	1/1	-	348,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

#### E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 30 minutes après que le calibrateur a été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELAI				
	0'	10'	20'	30'
C1	546,1	563,9	563,4	568,9
C2	86,6	88,7	89,0	85,9
C3	44,4	44,4	42,9	43,2
C4	122,4	123,0	122,6	121,0

#### F. Effet crochet

Un échantillon de plasma sur EDTA avec une concentration en ACTH de 69000 pg/ml donne un signal supérieur à la concentration du calibrateur le plus élevé.

#### XIV. LIMITATIONS

- Les échantillons de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris pour un diagnostic ou comme traitement peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent montrer des valeurs soit faussement élevées soit faussement basses lorsqu'ils sont analysés avec des trousseaux d'analyses utilisant des anticorps monoclonaux de souris.
- Des anticorps hétérophiles dans le sérum humain peuvent réagir avec le réactif immunoglobulines, interférant ainsi avec les méthodes d'analyse immunologiques in vitro. Les patients couramment en contact avec des animaux ou des produits de sérum animal peuvent être sujets à ces interférences. Des valeurs anormales peuvent être observées en cas de présence d'anticorps hétérophiles. Évaluer soigneusement les résultats des patients suspectés d'avoir ces anticorps. Si les résultats ne sont pas cohérents avec les autres observations cliniques, des informations supplémentaires doivent être demandées avant de poser le diagnostic.

#### XV. CONTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés en aliquotes. Ne pas congeler – décongeler plus de deux fois.
- Les critères d'acceptation de la différence entre les résultats des échantillons analysés en double doivent être basés sur les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

#### XVI. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs. La portée des taux en ACTH chez 47 patients normaux, exprimée comme 5% à 95% percentiles, était 9,6 à 49,7 pg/ml.

#### XVII. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

##### Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'<sup>125</sup>I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et  $\gamma$  (35.5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances

radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devra être conforme aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azoture de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azoture de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azoture dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

#### XVIII. BIBLIOGRAPHIE

- SMITH IA, FUNDER JW. **Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.** Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.
- LUMPKIN MD. **The regulation of ACTH secretion by IL-1.** Science 1987; 238:452-454.
- MILLER WL. **Molecular biology of steroid hormones synthesis.** Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.
- FRASER NL. **Storage of biological sample.** NASA Cr- 1967; 781.
- RAFF H. **Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.
- GOVERDE HJ. **Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson's syndrome.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.
- GOVERDE HJ. **The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.** Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.
- LAMBERT A. **On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.** Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.
- KRIEGER DT. **Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.
- KRIEGER DT. **Physiopathology of Cushing's disease.** Endocrine Review. 1983; 4:22-43.
- GANONG WF. **ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.** N Engl J Med. 1974; 290-1006.

**XIX. RESUME DU PROTOCOLE**

	<b>ACTIVITE TOTALE (<math>\mu</math>l)</b>	<b>CALIBRA- TEURS (<math>\mu</math>l)</b>	<b>ECHANTILLONS CONTRÔLES (<math>\mu</math>l)</b>
Calibrateurs (0 à 6)	-	200	-
Echantillons, Contrôles	-	-	200
Tampon d'incubation	-	50	50
Incubation	120 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).		
Séparation	-	Aspiration	
Solution de Lavage	-	2,0 ml	
Séparation	-	aspiration	
Solution de Lavage	-	2,0 ml	
Séparation	-	aspiration	
Traceur	100	100	100
Incubation	60 minutes à température ambiante sous agitation continue (400 rpm).		
Séparation	-	Aspiration	
Solution de Lavage	-	2,0 ml	
Séparation	-	aspiration	
Solution de Lavage	-	2,0 ml	
Séparation	-	aspiration	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		



de

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

# ACTH-IRMA

## I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem adrenokortikotropen Hormon (ACTH) in EDTA-Plasma.

## II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource ACTH-IRMA Kit
- B. **Katalognummer :** KIP0061 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

**Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:**

**Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91**

**Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75**

**E-mail Ordering : [ordering@diasource.be](mailto:ordering@diasource.be)**

## III. KLINISCHER HINTERGRUND

### A. Biologische Aktivitäten

Das Adrenokortikotrophe Hormon (ACTH oder Corticotrophin) ist ein Polypeptidhormon (von POMC, Proopiomelanocortin), welches durch Kortikotrope im Vorderlappen der Hirnanhangsdrüse, als Antwort auf das Corticotrophin- freisetzende Hormon (CRH) im Hypothalamus synthetisiert und sekretiert wird. Es besteht aus 39 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 4540 Da.

ACTH reguliert die Steroid-Synthese in der Nebennierenrinde. ACTH stimuliert die Sekretion von Cortisol aus den Nebennieren. Cortisol und andere Glukokorticoide erhöhen die Glukoseproduktion, verhindern die Proteinsynthese und fördern den Abbau von Proteinen, sie stimulieren die Lipolyse und beeinflussen immunologische und entzündliche Reaktionen. Cortisol induziert die Rückbildung des Thymus, welches eine Abnahme der normalen Thymusfunktion darstellt, die teilweise dazu beiträgt die Immunantwort zu verringern. Glukokorticoide helfen den Blutdruck aufrecht zu erhalten und bilden eine notwendige Komponente im Körper bei der Reaktion auf Stress. Die ACTH-Sekretion wird reguliert durch das Corticotrophin freisetzende Hormon (CRH) und durch Vasopressin (ADH). Cortisol wird reguliert über die Nebenniere und den Hypothalamus um die ACTH und CRH –Spiegel zu reduzieren. Unter normalen (non-stress) Bedingungen wird Cortisol in einem ausgeprägten zyklischen Rhythmus sekretiert, wobei höhere Spiegel am Morgen und niedrige am Abend erreicht werden. Unter Stressbedingungen ist die zyklische Veränderung unterdrückt.

Nicht durch die Nebenniere vermittelte Effekte: ACTH stimuliert die Freisetzung von MSH (Melanotropes Hormon), einem Wachstumshormon (GH), steigert die Lipolyse in Fettzellen (Adipozyten) und induziert neurologische Effekte ( wie Strecken und Gähnen). Vieles davon kommt vom Ursprung POMC. Die Lipolyse durch ACTH ist viel schwächer, als die von Lipotropin (LPH). ACTH ist eine biologische Vorstufe vom MSH.

In der Nebennierenrinde gibt es 2 Arten von ACTH-Rezeptoren, eine mit einem  $KD=1nM$ , aber nur ungefähr 60 Stück pro Zelle, während der andere ein  $KD=300nM$  aufweist und circa 600.000 mal pro Zelle auftritt. Das Vorhandensein von hoch- und niedrig affinen Rezeptoren für ACTH bedeutet, dass Gewebe nicht nur für das Vorhandensein von ACTH sensitiv sind, sondern auch für deren Konzentration.

### B. Klinische Anwendung

Zu viel ACTH kann zu einer Überproduktion von Cortisol führen, die Cushing Syndrom verursachen kann. Zu viel ACTH kann durch ein benignes Nebennieren-Adenom verursacht sein. Andere Ursachen für das Cushing Syndrom (zu viel Cortisol) schließen die ektopische Produktion von ACTH ein, die bei einigen Lungentumoren und benignen und bösartigen Nebennierentumoren beobachtet wurde. Die häufigste Ursache für Cushing Syndrom ist die exogene Aufnahme von Glukocortikoiden.

Symptome von Cushing Syndrom schließen Fettleibigkeit, siehe Extremitäten, Mondgesicht, Stiernacken, dünne Haut, oft Qetschungen, Muskelschwäche, Bluthochdruck, Arteriosklerose, Herzfehler, Ödeme, unregelmäßige Menstruation, psychologische Verwirrungen, Osteoporose, verstärkte Infektneigung und schlechte Wundheilung.

Die verringerte Sekretion von ACTH durch die Hirnanhangsdrüse wird als sekundäre Nebenniereninsuffizienz bezeichnet. Tertiäre Nebenniereninsuffizienz wird durch einen Fehler des Hypothalamus bei der Produktion von Corticotropin freisetzendem Hormon (CRH) verursacht, während die primäre Nebenniereninsuffizienz als Verlust von adrenocortikalen Hormonen infolge von Zerstörung oder Beeinträchtigung der Nebennierenrinde bezeichnet wird. Alle Patienten mit Nebenniereninsuffizienz zeigen Gewichtsverlust. Die sekundäre und tertiäre Nebenniereninsuffizienz wird teilweise durch ACTH Injektionen (Cortrosyn) diagnostiziert, um die Produktion von Cortisol zu simulieren.


#### IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource ACTH-IRMA ist ein Zwei-Schritt immunradiometrischer Assay in beschichteten Röhrchen.

Es ermöglicht die Bestimmung von intaktem humanen adrenocorticotropen Hormon (ACTH) in EDTA-Plasma. Für das 1-24 ACTH- Fragment (N-terminales Fragment) spezifische monoklonale Antikörper sind an die untere innere Fläche der Plastikröhrchen gebunden. Kalibratoren oder Proben werden den Röhrchen zugefügt. Nach 2 Stunden Inkubation wird der Überschuss von Antigen, mittelregionalen und C-terminalen Fragmenten ausgewaschen.

<sup>125</sup>I gelabelte polyklonale Antikörper, die spezifisch für das 1-24 ACTH Fragment (C-terminales Fragment) werden zugefügt. Nach 1 Stunde Inkubation und Waschen entspricht die an die Röhrchen gebundene Radioaktivität der Konzentration von intakter ACTH.

#### V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	Rekonstitution			
 Mit anti ACTH- beschichtete Röhrchen (monoklonale Antikörper)	2 x 48	<b>gebrauchsfertig</b>			
<table border="1" data-bbox="103 772 311 817"> <tr> <td>Ab</td> <td>125I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> TRACER: <sup>125</sup> Iodmarkierter Anti-ACTH (polyklonale Antikörper) in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Azid (<0.1%)	Ab	125I	CONC	1 Gefäß 0,650 ml 890 kBq	21 x mit Tracerpuffer <b>verdünnen</b> (siehe Sektion VII C).
Ab	125I	CONC			
<table border="1" data-bbox="103 952 279 996"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tracerpuffer: Boratpuffer mit Schafserum, EDTA und Azid (<0.1%)	TRACER	BUF	1 Gefäß 11 ml	<b>gebrauchsfertig</b>	
TRACER	BUF				
<table border="1" data-bbox="119 1064 255 1108"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Null Kalibrator in Humanplasma mit Thymol und Benzamidin	CAL	0	1 Gefäß lyophilisiert	5 ml Rekonstituierungslösung <b>zugeben</b>	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="119 1187 255 1232"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibrator - N = 1 to 6 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanplasma mit Thymol und Benzamidin	CAL	N	6 Gefäße lyophilisiert	1 ml Rekonstituierungslösung <b>zugeben</b>	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="103 1344 279 1388"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Rekonstituierungslösung: Boratpuffer mit EDTA und Natriumazid (<0,1%)	REC	SOLN	1 Gefäß 15 ml	<b>gebrauchsfertig</b>	
REC	SOLN				
<table border="1" data-bbox="103 1444 255 1489"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Inkubationspuffer: Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin, und Azid (<0,1%)	INC	BUF	1 Gefäß 6 ml	<b>gebrauchsfertig</b>	
INC	BUF				
<table border="1" data-bbox="103 1579 343 1624"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Waschlösung (Tween 20 - NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 40 ml	20 x mit dest. Wasser <b>verdünnen</b> (Magnetrührer benutzen).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="103 1668 295 1713"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontrollen - N = 1 or 2 Humanplasma und Thymol	CONTROL	N	2 Gefäße lyophilisiert	1 ml Rekonstituierungslösung <b>zugeben</b>	
CONTROL	N				

**Bemerkung:** Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.  
2. 1 pg der Standardzubereitung ist äquivalent zu 1 pg NIBSC 74/555

#### VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml und 3 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
3. 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
4. Absaugsystem (optional)

5. Vortex Mixer
6. Schüttler für Röhrchen (400rpm)
7. Magnetrührer
8. Jegl. Gamma-Counter, der <sup>125</sup>I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

#### VII. REAGENT PREPARATION

- A. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie den Nullstandard mit 5,0 ml Rekonstituierungslösung und die Kalibratoren 1-6 mit 1,0 ml Rekonstituierungslösung
- B. Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1,0 ml Rekonstituierungslösung
- C. Tracer:** Stellen Sie die benötigte Menge Tracerlösung her, indem Sie 50 µl Anti-ACTH-<sup>125</sup>I zu 1 ml Tracerpuffer geben. Benutzen Sie einen Vortex zur Homogenisierung.
- D. Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (20x) mit 19 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

#### VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Die Kalibratoren und Proben sind sehr instabil. Benutzung sofort nach der Rekonstitution oder sofort in Aliquots bei -20°C für bis zu 7 Wochen einfrieren. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei -20°C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

#### IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Es sollte EDTA Plasma verwendet und die üblichen Vorsichtsmaßnahmen bei Venenpunktur beachtet werden.
- Die Proben sollten direkt nach der Entnahme auf Eis gelagert oder in vorher gefrorene Röhrchen abgenommen werden. Separieren Sie die Proben sofort in einer Kühlzentrifuge (2-8°C). Werden die Proben nicht innerhalb einer Stunde verarbeitet, entfernen Sie den Plasmaüberstand und geben ihn in ein entsprechend etikettiertes Plastikaufbewahrungsgefäß. Frieren Sie das Plasma bei -70°C oder kälter ein. Es ist bis zu 45 Tage haltbar.
- Bei -20°C bleiben die Proben nicht stabil.
- Benutzen Sie keine hämolytierten oder lipämischen Proben.

#### X. DURCHFÜHRUNG

- A. Bemerkungen zur Durchführung**  
Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.  
Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.  
Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.  
Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

#### B. Durchführung

1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
2. Vortexen Sie Kalibratoren, Proben und Kontrollen kurz und geben Sie jeweils 200 µl in ihre Röhrchen.
3. Dispensieren sie 50 µl Inkubationspuffer in jedes Röhrchen, außer dem für die Gesamtaktivität.
4. Schütteln Sie das Rack mit den Röhrchen sanft mit der Hand, um angeheftete Luftblasen freizusetzen.
5. Inkubieren Sie 120 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).
6. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.

7. Waschen Sie die Röhrrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
8. Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
9. Waschen Sie die Röhrrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab.
10. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
11. Geben Sie 100 µl des Tracers in jedes Röhrrchen, einschließlic der unbeschichteten Röhrrchen für die Gesamtaktivität.
12. Schütteln Sie das Rack mit den Röhrrchen sanft mit der Hand, um angeheftete Luftblasen freizusetzen.
13. Inkubieren Sie 60 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).
14. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrrchens ab (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
15. Waschen Sie die Röhrrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
16. Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
17. Waschen Sie die Röhrrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab.
18. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
19. Werten Sie die Röhrrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

### XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
2. Tragen den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration ACTH (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
3. Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.

### XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

ACTH-IRMA		cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität		273476	100
Kalibrator	0,0 pg/ml	418	0,2
	9,6 pg/ml	1580	0,6
	31,2 pg/ml	3836	1,4
	97,2 pg/ml	10839	4,0
	295,4 pg/ml	27691	10,1
	1006,4 pg/ml	64156	23,5
	1931,9 pg/ml	93486	34,2

### XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

#### A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die offensichtliche Konzentration 3 Standardabweichungen über den Counts bei Nullbindung, war 1,16 pg/ml.

#### B. Spezifität

Möglicherweise interferierende Peptide werden EDTA-Plasma mit niedrigem und hohem ACTH-Gehalt zugesetzt. Die resultierende ACTH-Antwort wurde gemessen.

Zugesetzter Analyt zu einem EDTA-Plasma mit niedrigem Spiegel	Beobachtete ACTH Spiegel (pg/ml)	Zugesetzter Analyt zu einem EDTA-Plasma mit mittlerem Spiegel	Beobachtete ACTH Spiegel (pg/ml)
Keine Zugabe	0,9	ACTH 1-17 Fragment 100000 pg/ml	34,5
ACTH 1-17 Fragment 100000 pg/ml	0,8	ACTH 18-39 Fragment 100000 pg/ml	25,0
ACTH 18-39 Fragment 100000 pg/ml	7,1	ACTH Ratte 1000 pg/ml	33,5
ACTH Ratte 1000 pg/ml	364,7	ACTH Ratte 100000 pg/ml	450,0
αMSH 100000 pg/ml	1,8	βMSH 100000 pg/ml	31,6
βMSH 100000 pg/ml	0,9	βMSH 100000 pg/ml	33,0
βEndorphin 100000 pg/ml	1,1	βEndorphin 100000 pg/ml	32,8

Dieses zeigt, dass der ACTH-IRMA keine Kreuzreaktionen mit αMSH, βMSH und βEndorphin ACTH-Fragmenten, aber kreuzreagiert mit Ratten-ACTH zu 39%.

#### C. Präzision

##### INTRA-ASSAY

##### INTER-ASSAY

Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	19	17,5 ± 1,1	6,4	D	15	29,6 ± 1,4	4,8
B	20	69,3 ± 2,1	3,0	E	15	121,9 ± 7,5	6,2
C	20	386,7 ± 15,1	3,9				

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

#### D. Genauigkeit

##### VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünn.	Theoret. Konzent. (pg/ml)	Gemess. Konzent. (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,4
2	1/1	-	348,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

##### WIEDERFINDUNGSTEST

Zugeg. ACTH (pg/ml)	Wiedergef. ACTH (pg/ml)	Wiedergefunden (%)
1100,0	1128,0	102,5
550,0	552,5	100,5
275,0	273,8	99,6
137,5	149,0	108,4

#### E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrrchen zugefügt wird.

	ZEITDIFFERENCE			
	0'	10'	20'	30'
C1	546,1	563,9	563,4	568,9
C2	86,6	88,7	89,0	85,9
C3	44,4	44,4	42,9	43,2
C4	122,4	123,0	122,6	121,0

#### F. Hook-Effekt

Ein EDTA-Plasmaprobe mit einer ACTH-Konzentration von 69000 pg/ml erzeugt ein Signal, das über der höchsten Kalibratorkonzentration liegt.

#### XIV. ANWENDUNGSGRENZEN

- Proben von Patienten, die Zubereitungen von monoklonalen Maus-Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder zu niedrige Werte ergeben, wenn sie mit Testsystemen getestet werden, die monoklonale Maus Antikörper enthalten.
- Heterophile Antikörper im humanen Serum können mit Immunglobulinen der Reagenzien reagieren und so mit in vitro Immunoassays interferieren. Patienten, die routinemäßigen Umgang mit Tieren oder Tierseren haben, können zu dieser Interferenz neigen und so können anormale Werte in Gegenwart von heterophilen Antikörpern beobachtet werden. Ergebnisse von Patienten, bei denen diese Antikörper vermutet werden, müssen sorgfältig evaluiert werden. Wenn die Ergebnisse nicht mit anderen klinischen Beobachtungen übereinstimmen, sollten weitere Informationen vor der Diagnosestellung ermittelt werden.

#### XV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Erinnern Sie sich, dass zwei Gefrier-Auftau-Zyklen erlaubt sind.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

#### XVI. REFERENZINTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Der Bereich der ACTH-Werte bei 47 gesunden Patienten, ausgedrückt als 5% bis 95% Perzentilen, betrug 9,6 bis 49,7 pg/ml.

#### XVII. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

##### Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält <sup>125</sup>I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und  $\gamma$  (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausstattung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschriffe den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

#### XVIII. LITERATUR

1. SMITH IA, FUNDER JW.  
**Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.**  
Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.
2. LUMPKIN MD.  
**The regulation of ACTH secretion by IL-1.**  
Science 1987; 238:452-454.
3. MILLER WL.  
**Molecular biology of steroid hormones synthesis.**  
Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.
4. FRASER NL.  
**Storage of biological sample.**  
NASA Cr- 1967; 781.
5. RAFF H.  
**Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.
6. GOVERDE HJ.  
**Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson's syndrome.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.
7. GOVERDE HJ.  
**The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.**  
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.
8. LAMBERT A.  
**On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.**  
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.
9. KRIEGER DT.  
**Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.
10. KRIEGER DT.  
**Physiopathology of Cushing's disease.**  
Endocrine Review. 1983; 4:22-43.
11. GANONG WF.  
**ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.**  
N Engl J Med. 1974; 290-1006.

**XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS**

	<b>GESAMT- AKTIVITÄT (<math>\mu</math>l)</b>	<b>KALIBRA- TOREN (<math>\mu</math>l)</b>	<b>PROBEN, KONTROLLEN (<math>\mu</math>l)</b>
Kalibratoren (0-6) Proben, Kontrollen Inkubationspuffer	- - -	200 - 50	- 200 50
Inkubation	120 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm)		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen 2.0 ml absaugen 2.0 ml absaugen	
Tracer	100	100	100
Inkubation	60 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm)		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen 2.0 ml absaugen 2.0 ml absaugen	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		



Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

# ACTH-IRMA

## I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) in plasma EDTA

## II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource ACTH-IRMA Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP0061: 96 test
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:  
Tel: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

## III. INFORMAZIONI CLINICHE

### A. Attività biologiche

L'ormone adrenocorticotropo (ACTH o corticotropina) è un ormone polipeptidico, sintetizzato a partire dalla pro-opiomelanocortina (POMC) e secreto dalle cellule corticotrope del lobo anteriore dell'ipofisi in risposta all'azione dell'ormone ipotalamico di rilascio della corticotropina (CRH). Esso è formato da 39 aminoacidi e ha un peso molecolare di 4540 Da.

L'ACTH regola la sintesi steroidea da parte della corteccia surrenale e stimola la secrezione di cortisolo da parte delle ghiandole surrenali. Il cortisolo e gli altri glucocorticoidi favoriscono la gluconeogenesi, inibiscono la sintesi proteica, aumentano il catabolismo proteico, stimolano la lipolisi e influenzano la risposta immune e infiammatoria. Il cortisolo induce un processo involutivo del timo che si traduce in un declino della normale funzionalità timica, con conseguente riduzione della risposta immunitaria. I glucocorticoidi contribuiscono alla regolazione della pressione sanguigna e rappresentano un fattore essenziale nella risposta organica allo stress. La secrezione di ACTH è regolata dall'ormone di rilascio della corticotropina (CRH) e dalla vasopressina (ADH). Il cortisolo esercita un'azione di feedback back su ipofisi e ipotalamo provocando una riduzione dei livelli di ACTH e CRH. In condizioni basali (non-stress), la produzione di cortisolo segue un pronunciato ritmo circadiano, con livelli più elevati nelle prime ore del mattino e livelli inferiori nelle ore serali. In condizioni di stress, si verifica una perdita del ritmo circadiano.

Effetti mediati, non sulle ghiandole surrenali: l'ACTH stimola il rilascio di MSH (ormone melanotropo) e di GH (ormone della crescita), aumenta la lipolisi nelle cellule adipose (lipociti) e induce effetti neurologici (stiracchiamento e sbadiglio). La maggior parte di tali effetti è associabile alla sua derivazione dalla POMC. La lipolisi stimolata da ACTH è significativamente inferiore a quella stimolata dalla lipotropina (LPH). L'ACTH è un precursore di  $\alpha$ -MSH. Nella corteccia surrenale vi sono due tipi di recettori per ACTH, quelli con  $K_d=1nM$ , in numero di 60/cellula soltanto, e quelli con  $K_d=300nM$ , in numero di 600.000/cellula. La presenza di recettori per ACTH ad alta e bassa affinità indica che i tessuti non sono sensibili soltanto alla presenza di ACTH, ma anche alla sua concentrazione.

### B. Applicazioni cliniche

Un eccesso di ACTH può dar luogo ad una sovrapproduzione di cortisolo, possibile causa di sviluppo della sindrome di Cushing. L'eccessiva produzione di ACTH può essere provocata dalla presenza di un adenoma pituitario (benigno). Altre cause possibili della sindrome di Cushing (cortisolo in eccesso) sono la produzione ectopica di ACTH, associabile ad alcune forme di tumore polmonare, e la presenza di tumori surrenalici benigni o maligni. La causa più comune della sindrome di Cushing è la somministrazione esogena di glucocorticoidi.


La sindrome di Cushing si accompagna a sintomi quali obesità a livello del tronco contrapposta a dimagrimento degli arti, facies lunare, gobba di bufalo, assottigliamento della cute, facile comparsa di lividi, debolezza muscolare, ipertensione, aterosclerosi, insufficienza cardiaca congestizia, edema, irregolarità mestruale, disturbi psichici, osteoporosi, elevata predisposizione alle infezioni, difficoltà di cicatrizzazione.

La ridotta secrezione di ACTH da parte dell'ipofisi dà luogo alla cosiddetta insufficienza surrenalica secondaria. L'insufficienza surrenalica terziaria è invece il risultato di una ridotta capacità da parte dell'ipotalamo a produrre l'ormone di rilascio della corticotropina (CRH), mentre l'insufficienza surrenalica primaria risulta associata ad una ridotta produzione degli ormoni corticosurrenali derivante da distruzione o alterazione della corteccia surrenale. In tutti i pazienti affetti da insufficienza surrenalica si evidenzia una perdita di peso. Le insufficienze surrenaliche secondaria e terziaria vengono in parte diagnosticate mediante iniezione di ACTH (Cortrosyn) stimolante la produzione di cortisolo.

#### IV. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit DIAsource ACTH-IRMA è un dosaggio immunoradiometrico a due fasi con separazione coated tube per la determinazione dei livelli di ormone adrenocorticotropo umano intatto (ACTH) in plasma EDTA. Anticorpi monoclonali specifici per il frammento ACTH 1-24 (frammento N-terminale) sono adesi alla superficie interna del fondo di provette di plastica. In tali provette viene effettuata la distribuzione di campioni e standard. Dopo un'incubazione di due ore, la fase di lavaggio provvede alla rimozione di un'eventuale eccesso di antigene, dei frammenti della regione medio molecolare e C-terminale. Si procede quindi all'aggiunta di anticorpi policlonali marcati con <sup>125</sup>I, specifici per il frammento ACTH 24-39 (frammento C-terminale). Dopo un'ora di incubazione e successivo lavaggio, la residua radioattività legata alla provetta riflette la concentrazione di ACTH intatto.

#### V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Volume di ricostituzione			
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti ACTH (anticorpi monoclonali)	2 x 48	Pronte per l'uso			
<table border="1" data-bbox="119 728 319 772"> <tr> <td>Ab</td> <td>125I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Marcato: anti-ACTH (Anticorpi monoclonali) marcati con <sup>125</sup> I in tampone fosfato con BSA e sodio azide (<0,1%)	Ab	125I	CONC	1 flacone 0,650 ml 890 kBq	Diluire 21 x con tampone marcato (veda sezione VII.C)
Ab	125I	CONC			
<table border="1" data-bbox="103 862 287 907"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampone marcato: Tampone Borato con siero di pecora, EDTA e azide (<0,1%)	TRACER	BUF	1 flacone 11 ml	Pronto per l'uso	
TRACER	BUF				
<table border="1" data-bbox="135 974 271 1019"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Calibratore zero in plasma umano, contenente timolo e benzamidina	CAL	0	1 flacone liofiliz.	Aggiungere 5 ml di soluzione di ricostituzione	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="135 1086 271 1131"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibratore 1-6 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in plasma umano, contenente timolo e benzamidina	CAL	N	6 flaconi liofiliz.	Aggiungere 1 ml di soluzione di ricostituzione	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="103 1243 287 1288"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Soluzione di ricostituzione: Tampone Borato con EDTA e sodio azide (<0,1%)	REC	SOLN	1 flacone 15 ml	Pronto per l'uso	
REC	SOLN				
<table border="1" data-bbox="167 1355 343 1400"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampone incubazione: tampone fosfato con BSA e azide (<0,1%)	INC	BUF	1 flacone 6 ml	Pronto per l'uso	
INC	BUF				
<table border="1" data-bbox="103 1444 295 1489"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Tampone di lavaggio (Tween - NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 40 ml	Diluire 20 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="103 1556 319 1601"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano, contenente timolo	CONTROL	N	2 flaconi liofiliz.	Aggiungere 1 ml di soluzione di ricostituzione	
CONTROL	N				

Note: 1. Usare lo calibratore zero per diluire i campioni.  
2. 1 pg della preparazione standard è equivalente a 1 pg NIBSC 74/555

#### VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata.
2. Pipette per dispensare 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml e 3 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Agitatore rotante (400 rpm)
6. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
7. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
8. Contatore gamma con finestra per <sup>125</sup>I (efficienza minima 70%)

#### VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratore:** Ricostituire il calibratore zero con 5 ml di soluzione di ricostituzione e i calibratori 1-6 con 1,0 ml.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 1,0 ml di Soluzione di ricostituzione.
- C. **Marcato:** preparare un adeguato volume della soluzione marcato aggiungendo 50 µl di anti-ACTH<sup>125</sup> ad 1 ml di Tampone marcato. Utilizzare il vortex per omogeneizzare.
- D. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 19 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (20 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

#### VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Calibratori e controlli sono molto instabili, utilizzarli immediatamente dopo ricostituzione, congelarli immediatamente in aliquote e mantenerli a -20°C per 7 settimane. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a -20°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

#### IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- \* E' indispensabile l'utilizzo di plasma EDTA. Per il prelievo, rispettare le normali precauzioni.
- \* I campioni prelevati dovranno essere posti immediatamente in ghiaccio o dispensati in provette preventivamente raffreddate. Se non si procede subito all'esecuzione del test (entro un'ora), effettuare immediatamente la separazione in centrifuga raffreddata (2-8°C), e trasferire il surnatante in una provetta di conservazione in plastica adeguatamente contrassegnata. Congelare a -70°C o a temperature inferiori, per un massimo di 45 giorni.
- \* I campioni potrebbero non risultare stabili se conservati a -20°C.
- \* Non utilizzare campioni emolizzati o lipemici.

#### X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. **Avvertenze generali**  
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.  
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.  
L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.  
Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

#### B. Metodo del dosaggio

1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
2. Agitare brevemente su vortex standard, campioni e controlli. Dispensare 200 µl di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
3. Dispensare 50 µl di tampone di incubazione in ogni provetta ad eccezione di quelle per i conteggi totali.
4. Agitare manualmente con delicatezza il portaprovette in modo da eliminare eventuali bolle d'aria.
5. Incubare 120 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm).
6. Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
8. Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
9. Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale,

- con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare.
10. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
  11. Dispensare 100 µl di marcato in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
  12. Agitare manualmente con delicatezza il portaprovette in modo da eliminare eventuali bolle d'aria.
  13. Incubare 60 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm).
  14. Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
  15. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
  16. Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
  17. Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare.
  18. Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
  19. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

#### XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
2. Costruire la curva di calibrazione ponendo in ordinata le medie dei colpi per minuto (cpm) dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di ACTH. Scartare i duplicati palesemente discordanti.
3. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
4. E' possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

#### XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

Il sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di ACTH in campioni e controlli al posto della curva standard, che va eseguita per ogni dosaggio.

ACTH-IRMA		cpm	B/T (%)
Attività totale		273476	100
Calibratore	0,0 pg/ml	418	0,2
	9,6 pg/ml	1580	0,6
	31,2 pg/ml	3836	1,4
	97,2 pg/ml	10839	4,0
	295,4 pg/ml	27691	10,1
	1006,4 pg/ml	64156	23,5
	1931,9 pg/ml	93486	34,2

#### XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

##### A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. Il limite di rilevazione, definito come concentrazione apparente più tre deviazioni standard, del valore di cpm medio dello standard zero, è risultato pari a 1,16 pg/ml.

##### B. Specificità

In seguito ad aggiunta di peptidi possibilmente interferenti in campioni di plasma EDTA contenenti rispettivamente bassi e alti livelli di ACTH si è andata a misurare la risposta apparente dell'ACTH.

Analita aggiunto a plasma EDTA con livello basso di ACTH	Livello ACTH osservato (pg/ml)	Analita aggiunto a plasma EDTA con livello medio di ACTH	Livello ACTH osservato (pg/ml)
Niente	0,9	Niente	34,5
ACTH frammento 1-17 100000 pg/ml	0,8	ACTH frammento 1-17 100000 pg/ml	25,0
ACTH frammento 18-39 100000 pg/ml	7,1	ACTH frammento 18-39 100000 pg/ml	33,5
ACTH di ratto 1000 pg/ml	364,7	ACTH di ratto 1000 pg/ml	450,0
αMSH 100000 pg/ml	1,8	αMSH 100000 pg/ml	31,6
βMSH 100000 pg/ml	0,9	βMSH 100000 pg/ml	33,0
βEndorfina 100000 pg/ml	1,1	βEndorfina 100000 pg/ml	32,8

I risultati della tabella dimostrano che il test ACTH-IRMA non cross reagisce con frammenti di ACTH, αMSH, βMSH and βEndorfina ma cross reagisce con ACTH di ratto al 39%.

#### C. Precisione

##### INTRA SAGGIO

##### INTER SAGGIO

Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	19	17,5 ± 1,1	6,4	D	15	29,6 ± 1,4	4,8
B	20	69,3 ± 2,1	3,0	E	15	121,9 ± 7,5	6,2
C	20	386,7 ± 15,1	3,9				

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

#### D. Accuratezza

##### TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pg/ml)	Concentrazione misurata (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,4
2	1/1	-	348,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

##### TEST DI RECUPERO

ACTH aggiunta (pg/ml)	ACTH recuperata (pg/ml)	Recupero (%)
1100,0	1128,0	102,5
550,0	552,5	100,5
275,0	273,8	99,6
137,5	149,0	108,4

#### E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

	TEMPO TRASCORSO			
	0'	10'	20'	30'
C1	546,1	563,9	563,4	568,9
C2	86,6	88,7	89,0	85,9
C3	44,4	44,4	42,9	43,2
C4	122,4	123,0	122,6	121,0

#### F. Effetto hook

Un campione di plasma EDTA contenente livelli di ACTH pari a 69000 pg/ml dà luogo a un segnale superiore a quello del calibratore a concentrazione più elevata.

#### XIV. LIMITAZIONI

- Campioni di pazienti che abbiano assunto preparazioni a base di anticorpi monoclonali murini a scopo diagnostico o terapeutico potrebbero contenere anticorpi umani antimurini (HAMA). Tali campioni, quando testati con metodiche basate sull'impiego di anticorpi monoclonali murini, potrebbero produrre valori falsamente elevati o ridotti.
- Nell'esecuzione di tecniche di immunodosaggio in vitro, la presenza in campioni di siero umano di anticorpi eterofili che possono reagire con immunoglobuline reattive può dar luogo ad interferenze. Pazienti sistematicamente esposti al contatto con animali o con prodotti derivanti da siero animale possono essere oggetto di tale tipo di

interferenza, con conseguente riscontro di risultati anomali in caso di presenza di anticorpi eterofili. Si raccomanda pertanto di valutare attentamente i risultati relativi ai pazienti con sospetta presenza di tale tipo di anticorpo.  
Qualora i risultati non fossero in linea con le altre osservazioni cliniche si renderà necessaria la raccolta di ulteriori informazioni prima della formulazione di una diagnosi.

#### XV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un'aliquota più di due volte.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

#### XVI. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori.  
Il range dei livelli di ACTH in 47 pazienti normali, espresso in percentili da 5% a 95% era compreso tra 9,6 e 49,7 pg/ml.

#### XVII. PRECAUZIONI PER L'USO

##### Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.  
Il kit contiene <sup>125</sup>I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e  $\gamma$  (35.5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, a detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

#### XVIII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. SMITH IA, FUNDER JW.  
**Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.**  
Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.
2. LUMPKIN MD.  
**The regulation of ACTH secretion by IL-1.**  
Science 1987; 238:452-454.
3. MILLER WL.  
**Molecular biology of steroid hormones synthesis.**  
Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.

4. FRASER NL.  
**Storage of biological sample.**  
NASA Cr- 1967; 781.
5. RAFF H.  
**Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.
6. GOVERDE HJ.  
**Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson's syndrome.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.
7. GOVERDE HJ.  
**The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.**  
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.
8. LAMBERT A.  
**On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.**  
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.
9. KRIEGER DT.  
**Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.
10. KRIEGER DT.  
**Physiopathology of Cushing's disease.**  
Endocrine Review. 1983; 4:22-43.
11. GANONG WF.  
**ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.**  
N Engl J Med. 1974; 290-1006.

#### XIX. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale $\mu$ l	Calibratore $\mu$ l	CAMPIONI Controlli $\mu$ l
Calibratore (0 - 6)	-	200	-
Campioni, controlli	-	-	200
Tampone incubazione	-	50	50
Incubazione	120 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm)		
Separazione			Aspirare 2 ml
Soluzione di lavoro tampone di lavaggio			Aspirare 2 ml
Separazione			Aspirare
Soluzione di lavoro tampone di lavaggio			
Separazione			Aspirare
Marcato	100	100	10
Incubazione	60 minuti a temperatura ambiente in agitazione (400 rpm)		
Separazione			Aspirare 2 ml
Soluzione di lavoro tampone di lavaggio			Aspirare 2 ml
Separazione			Aspirare
Soluzione di lavoro tampone di lavaggio			
Separazione			Aspirare
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

# ACTH-IRMA

## I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de hormona adrenocorticotropa humana (ACTH) en plasma con EDTA.

## II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre:** DIAsource ACTH-IRMA Kit
- B. Número de Catálogo:** KIP0061 : 96 tests
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:**

**Tel : +32 (0)10 84.99.11**

**Fax : +32 (0)10 84.99.91**

## III. INFORMACIÓN CLÍNICA

### A. Actividades Biológicas

La hormona adrenocorticotropa (ACTH o corticotropina) es una hormona polipeptídica sintetizada (a partir de de POMC, proopiomelanocortina) y secretada a partir de corticotropas en el lóbulo anterior de la hipófisis en respuesta a la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) secretada por el hipotálamo. Está formada por 39 aminoácidos con un peso molecular de 4540 Da.

La ACTH regula la síntesis de esteroides en la corteza suprarrenal. La ACTH estimula la secreción de cortisol en las glándulas suprarrenales. El cortisol y otros glucocorticoides aumentan la producción de glucosa, inhiben la síntesis de proteínas y aumentan la degradación proteica, estimulan la lipólisis e influyen en las respuestas inmunológicas e inflamatorias. El cortisol induce la involución del timo que es un deterioro de la función tímica normal que se explica en parte por su capacidad de reducir la respuesta del sistema inmunitario. Los glucocorticoides ayudan a mantener la presión sanguínea y constituyen un componente esencial de la respuesta corporal al estrés. La secreción de ACTH está regulada por la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) y la vasopresina (ADH). El cortisol realiza un sistema de retroalimentación negativa sobre la hipófisis y el hipotálamo suprimiendo los niveles de ACTH y CRH. En condiciones basales (sin estrés), el cortisol se secreta en respuesta a un ritmo cardíaco pronunciado, con niveles mayores a primer hora de la mañana y con niveles menores a última hora de la tarde. En condiciones de estrés, se produce un pico en la variación circadiana.

Efectos no mediados por la glándula suprarrenal: La ACTH estimula la liberación de MSH (hormona melanotrópica) y GH (hormona del crecimiento), aumenta la lipólisis en las células grasas (adipocitos) e induce efectos neurológicos (como el estiramiento y el bostezo). Mucho de esto está relacionado con su origen a partir de POMC. La lipólisis producida por ACTH es mucho más débil que la de la lipotropina (LPH). La ACTH es un precursor de la  $\alpha$ -MSH.

En la corteza suprarrenal, hay dos tipos de receptores de ACTH, uno con una  $KD = 1$  nM, pero sólo existen aproximadamente 60 por célula, mientras que el otro tiene una  $KD = 300$  nM, pero con aproximadamente 600.000 por célula. La presencia de receptores de alta y baja afinidad por la ACTH, significa que los tejidos no sólo son sensibles a la presencia de ACTH, sino también a su concentración.

### B. Aplicación clínica

Demasiada ACTH puede resultar en una superproducción de cortisol que puede provocar un síndrome de Cushing. Dichos niveles elevados de ACTH pueden ser provocados por un adenoma hipofisario benigno. Otras causas del síndrome de Cushing (demasiado cortisol) incluyen una producción ectópica de ACTH, como ocurre en algunos tumores pulmonares, y tumores y cánceres suprarrenales. La causa más común del síndrome de Cushing es una ingestión exógena de glucocorticoides.

Los síntomas del síndrome de Cushing incluyen obesidad troncular, degeneración de las extremidades, cara de luna, joroba de grasa, adelgazamiento de la piel, propensión a los hematomas, debilidad muscular, hipertensión, arterosclerosis, fallo cardíaco congestivo, edema, alteraciones menstruales, alteraciones psicológicas, osteoporosis, aumento de infecciones y problemas de cicatrización.


Una secreción reducida de ACTH por la hipófisis se denomina insuficiencia suprarrenal secundaria. La insuficiencia suprarrenal terciaria está provocada por un fallo en la producción hipotalámica de hormona liberadora de la corticotropina (CRH) mientras que la insuficiencia suprarrenal primaria se define como una pérdida de hormonas adrenocorticotropas debida a la destrucción o lesión de la corteza suprarrenal. Todos los pacientes con una insuficiencia suprarrenal presentan pérdida de peso. La insuficiencia suprarrenal secundaria y terciaria se diagnostica en parte mediante la inyección de ACTH (Cortrosyn) para ver la estimulación de la producción de cortisol.

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

DIASource ACTH-IRMA es un ensayo inmunoradiométrico de dos pasos basado en la separación en tubos recubiertos. Permite determinar la hormona adrenocorticotropa humana (ACTH) en plasma con EDTA. Se acoplan anticuerpos monoclonales específicos para el fragmento 1-24 de la ACTH (fragmento N terminal) a la superficie inferior e interior de los tubos de plástico. A los tubos se añaden calibradores o muestras. Tras 2 horas de incubación, los lavados eliminan el posible exceso de antígeno y los fragmentos de la región media y C-terminal.

Se añaden anticuerpos policlonales marcados con I<sup>125</sup> específicos para el fragmento 24-39 de la ACTH (fragmento C terminal). Tras 1 hora de incubación y de los lavados, la radioactividad restante unida al tubo refleja la concentración de ACTH intacta.

#### V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 test Kit	Reconstitución			
 Tubos recubiertos con anti ACTH (anticuerpos monoclonales)	2 x 48	Listo para uso			
<table border="1" data-bbox="87 728 295 772"> <tr> <td>Ab</td> <td>125I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> TRAZADOR: anti-ACTH (anticuerpos policlonales) marcado con I <sup>125</sup> en tampón fosfato con albúmina bovina, y azida (<0,1%)	Ab	125I	CONC	1 vial 0,650 ml 890 kBq	Diluir 21 x con tampón marcador (ver sección VII.C)
Ab	125I	CONC			
<table border="1" data-bbox="95 896 287 940"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampón marcador: Tampón de borato con suero de oveja, EDTA y azida (<0,1%)	TRACER	BUF	1 vial 11 ml	Listo para uso	
TRACER	BUF				
<table border="1" data-bbox="95 1030 223 1075"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Calibrador cero en plasma humano con thymol y benzamidina	CAL	0	1 vial liofilizado	Añadir 5 ml de solución de reconstitución	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="95 1153 231 1198"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibradores N = 1 a 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en plasma humano con thymol y benzamidina	CAL	N	6 viales liofilizados	Añadir 1 ml de solución de reconstitución	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="95 1310 287 1355"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Solución de reconstitución: Tampón de borato con EDTA y azida sódica (<0,1%)	REC	SOLN	1 vial 15 ml	Listo para uso	
REC	SOLN				
<table border="1" data-bbox="167 1433 343 1478"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampón de incubación: Tampón fosfato con albúmina bovina y azida (<0,1%)	INC	BUF	1 vial 6 ml	Listo para uso	
INC	BUF				
<table border="1" data-bbox="95 1534 287 1579"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Solución de lavado (Tween 20 - NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 40 ml	Diluir 20 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="119 1624 279 1668"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y thymol	CONTROL	N	2 viales liofilizados	Añadir 1 ml de solución de reconstitución	
CONTROL	N				

**Nota:** 1. Para diluciones de muestras utilizar calibrador cero.  
2. 1 pg de la preparación del calibrador es equivalente a 1 pg NIBSC 74/555

#### VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml y 3 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador de tubos (400rpm)
6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado

7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir I<sup>125</sup> (mínima eficiencia 70%)

#### VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. Calibradores:** Reconstituir el calibrador cero con 5,0 ml de solución de reconstitución y los calibradores 1-6 con 1,0 ml.
- B. Controles:** Reconstituir los controles con 1,0 ml de solución de reconstitución.
- C. Marcador:** Preparar un volumen adecuado de solución marcadora añadiendo 50 µl de anti ACTH I<sup>125</sup> a 1 ml de tampón marcador.
- D. Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 19 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (20x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

#### VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Los calibradores y controles son muy inestables, por lo que deben utilizarse inmediatamente después de la reconstitución, congelarse enseguida en partes alícuotas y mantenerse a -20° C durante 7 semanas. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a -20°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

#### IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Se debe usar plasma con EDTA y hay que tomar las precauciones habituales para una venopunción.
- Las muestras deben ser tomadas e inmediatamente colocadas en hielo o transferidas a tubos previamente enfriados. Separar inmediatamente en una centrífuga refrigerada (2-8 °C). Si no se van a ensayar inmediatamente (en una hora), transferir el sobrenadante de plasma a recipientes plásticos de almacenamiento etiquetados y congelar a una temperatura de -70 °C o inferior hasta un máximo de 45 días.
- Puede que las muestras no sean estables si se almacenan a -20 °C.
- No usar muestras hemolizadas o lipémicas.

#### X. PROTOCOLO

##### A. Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso. Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra. El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorará la precisión. Respetar los tiempos de incubación. Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

##### B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 200 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispense 50 µl de tampón de incubación en cada tubo, excepto los de los recuentos totales.
4. Agitar suavemente con la mano la gradilla que contiene los tubos para eliminar cualquier posible burbuja de aire.
5. Incubar durante 120 minutos a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
6. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la

- adición de la Solución de lavado.
8. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
  9. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar.
  10. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
  11. Dispensar 100 µL del trazador en cada tubo, incluyendo los tubos correspondientes a las Cuentas Totales.
  12. Agitar suavemente con la mano la gradilla que contiene los tubos para eliminar cualquier posible burbuja de aire.
  13. Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
  14. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
  15. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
  16. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
  17. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar.
  18. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
  19. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

## XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Representar las c.p.m. (ordenada) para cada calibrador frente a las concentraciones de ACTH (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos de calibración, rechazando los extremos claros.
3. Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
4. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de cálculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica "4 parámetros".

## XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

ACTH-IRMA		cpm	B/T (%)
Cuentas Totales		273476	100
Calibrador	0,0 pg/ml	418	0,2
	9,6 pg/ml	1580	0,6
	31,2 pg/ml	3836	1,4
	97,2 pg/ml	10839	4,0
	295,4 pg/ml	27691	10,1
	1006,4 pg/ml	64156	23,5
	1931,9 pg/ml	93486	34,2

## XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

### A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente con tres desviaciones típicas sobre los recuentos medios a una unión nula, fue de 1,16 pg/ml.

### B. Especificidad

Se añadieron péptidos posibles de interferencia a un plasma con EDTA y niveles bajos y altos de ACTH. Se midió la respuesta aparente a ACTH.

Analito añadido a un plasma con EDTA y niveles bajos de ACTH	Nivel de ACTH observado (pg/ml)	Analito añadido a un plasma con EDTA y niveles medios de ACTH	Nivel de ACTH observado (pg/ml)
Nada	0,9	Nada	34,5
fragmento 1-17 de ACTH 100000 pg/ml	0,8	fragmento 1-17 de ACTH 100000 pg/ml	25,0
fragmento 18-39 de ACTH 100000 pg/ml	7,1	fragmento 18-39 de ACTH 100000 pg/ml	33,5

ACTH de rata	1000 pg/ml	364,7	ACTH de rata	1000 pg/ml	450,0
α-MSH	100000 pg/ml	1,8	α-MSH	100000 pg/ml	31,6
β-MSH	100000 pg/ml	0,9	β-MSH	100000 pg/ml	33,0
β-endorfina	100000 pg/ml	1,1	β-endorfina	100000 pg/ml	32,8

Esto demuestra que ACTH-IRMA no presenta reacción cruzada con los fragmentos de ACTH, α-MSH, β-MSH y β-endorfina pero sí existe con la ACTH de rata en un 39%.

### C. Precisión

#### PRECISIÓN INTRA-ENSAYO

#### PRECISIÓN INTER-ENSAYO

Suero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	19	17,5 ± 1,1	6,4	D	15	29,6 ± 1,4	4,8
B	20	69,3 ± 2,1	3,0	E	15	121,9 ± 7,5	6,2
C	20	386,7 ± 15,1	3,9				

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

### D. Exactitud

#### TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (pg/ml)	Concent. Medida (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,4
2	1/1	-	348,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Las muestras fueron diluidas con el calibrador cero.

#### TEST DE RECUPERACIÓN

ACTH añadido (pg/ml)	ACTH Recuperado (pg/ml)	Recuperado (%)
1100,0	1128,0	102,5
550,0	552,5	100,5
275,0	273,8	99,6
137,5	149,0	108,4

### E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos recubiertos.

	TIEMPO DE ESPERA			
	0'	10'	20'	30'
C1	546,1	563,9	563,4	568,9
C2	86,6	88,7	89,0	85,9
C3	44,4	44,4	42,9	43,2
C4	122,4	123,0	122,6	121,0

### F. Efecto "hook"

Una muestra de plasma con EDTA y una concentración de ACTH de 69000 pg/ml tienen una señal superior a la concentración de calibrador más alta.

#### XIV. LIMITACIONES

- Es posible que las muestras de pacientes que han recibido preparaciones de anticuerpos monoclonales de ratón para diagnóstico o terapia, puedan contener anticuerpos humanos anti ratón (HAMA). Los resultados de estas muestras analizadas con kits que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón, pueden dar valores falsamente aumentados o disminuidos.
- Los anticuerpos heterófilos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas que forman parte del reactivo, interfiriendo con los inmunoensayos in vitro. Pacientes que en forma rutinaria están en contacto con animales o productos derivados de suero animal, pueden tender a presentar esta interferencia y se pueden observar valores anómalos en caso de haber presencia de anticuerpos heterófilos. Evalúe cuidadosamente los resultados de aquellos pacientes sospechosos de tener estos anticuerpos. Si los resultados no concuerdan con otras observaciones clínicas, será necesario obtener información adicional antes de hacer un diagnóstico.

#### XV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, los cuales se guardan en alícuotas congeladas. No congelar y descongelar más de dos veces.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

#### XVI. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de guía; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales. El alcance de los niveles de ACTH levels en 47 pacientes normales, expresado como percentilos de 5% a 95% fue 9,6 a 49,7 pg/ml.

#### XVII. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

##### Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene  $I^{125}$  (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos  $\gamma$  (35,5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

#### XVIII. BIBLIOGRAFIA

1. SMITH IA, FUNDER JW. **Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.**

- Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.
- LUMPKIN MD. **The regulation of ACTH secretion by IL-1.** Science 1987; 238:452-454.
- MILLER WL. **Molecular biology of steroid hormones synthesis.** Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.
- FRASER NL. **Storage of biological sample.** NASA Cr- 1967; 781.
- RAFF H. **Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.
- GOVERDE HJ. **Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson's syndrome.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.
- GOVERDE HJ. **The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.** Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.
- LAMBERT A. **On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.** Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.
- KRIEGER DT. **Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.
- KRIEGER DT. **Physiopathology of Cushing's disease.** Endocrine Review. 1983; 4:22-43.
- GANONG WF. **ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.** N Engl J Med. 1974; 290-1006.

#### XIX. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	CALIBRADOR ES (µl)	MUESTRAS CONTROL(ES) (µl)
Calibradores (0 al 6)	-	200	-
Muestras, controles	-	-	200
Tampón de incubación	-	50	50
Incubación	120 minutos a T.A en agitación constante (400 rpm)		
Separación	-		aspirar
Solución de Lavado	-		2,0 ml
Separación	-		aspirar
Solución de Lavado	-		2,0 ml
Separación	-		aspirar
Trazador	100	100	100
Incubación	60 minutos a T.A en agitación constante (400 rpm)		
Separación	-		aspirar
Solución de Lavado	-		2,0 ml
Separación	-		aspirar
Solución de Lavado	-		2,0 ml
Separación	-		aspirar
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		



el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

# ACTH-IRMA

## I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Κιτ ανοσοραδιομετρικού προσδιορισμού για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης φλοιοτρόπου ορμόνης (ACTH) σε EDTA πλάσμα.

## II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία:** Κιτ ACTH-IRMA της DIASource
- B. Αριθμός καταλόγου:** KIP0061: 96 εξετάσεις
- Γ. Κατασκευάζεται από την:** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:  
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

## III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

### A Βιολογικές δράσεις

Η φλοιοτρόπος ορμόνη (ACTH ή κορτικοτροπίνη) είναι μια πολυπεπτιδική ορμόνη η οποία συντίθεται από την POMC (προ-οπιομελανοκορτίνη) και εκκρίνεται από κορτικοτρόφα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης ως απόκριση στην κορτικοεκλυτίνη (CRH), την οποία απελευθερώνει ο υποθάλαμος. Αποτελείται από 39 αμινοξέα και το μοριακό της βάρος είναι 4540 Da.

Η ACTH ρυθμίζει τη σύνθεση των στεροειδών στο φλοιό των επινεφριδίων. Η ACTH διεγείρει την έκκριση κορτιζόλης από τα επινεφρίδια. Η κορτιζόλη και άλλα γλυκοκορτικοειδή αυξάνουν την παραγωγή γλυκόζης, αναστέλλουν τη σύνθεση πρωτεϊνών και αυξάνουν τον καταβολισμό τους, διεγείρουν τη λιπόλυση και επηρεάζουν ανοσολογικές και αντιφλεγμονώδεις αντιδράσεις. Η κορτιζόλη επάγει την υποστροφή του θύμου αδένου, την έκπτωση δηλαδή της φυσιολογικής λειτουργίας του. Στο γεγονός αυτό, οφείλεται εν μέρει η ικανότητά της να καταστέλλει την αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα γλυκοκορτικοειδή βοηθούν στη διατήρηση της αρτηριακής πίεσης και αποτελούν ουσιώδες συστατικό της αντίδρασης του οργανισμού στο στρες. Η έκκριση της ACTH ρυθμίζεται από την κορτικοεκλυτίνη (CRH) και από την αντιδιουρητική ορμόνη (ADH). Η κορτιζόλη δρα με ανατροφοδότηση στην υπόφυση και τον υποθάλαμο, αναστέλλοντας την έκκριση της ACTH και της CRH. Η βασική (όχι υπό συνθήκες στρες) έκκριση της κορτιζόλης χαρακτηρίζεται από έναν ευδιάκριτο κερκάρδιο ρυθμό, με υψηλότερα επίπεδα τις πρώτες πρωινές ώρες και χαμηλά επίπεδα αργά το βράδυ. Σε συνθήκες στρες η κερκάρδια διακύμανση αμβλύνεται.

Επιδράσεις που δεν μεσολαβούνται από τα επινεφρίδια: Η ACTH διεγείρει την απελευθέρωση της μελανοτροπίνης (MSH), της αυξητικής ορμόνης (GH), αυξάνει τη λιπόλυση στα λιποκύτταρα και επάγει νευρολογικά φαινόμενα (όπως εκτατικές κινήσεις και χασμουρητό). Πολλές από αυτές σχετίζονται με την προέλευση της από την POMC. Η λιπόλυση που προκαλεί η ACTH είναι αρκετά ασθενέστερη από εκείνη της λιποτροπίνης (LPH). Η ACTH είναι πρόδρομη ουσία της  $\alpha$ -MSH.

Στο φλοιό των επινεφριδίων υπάρχουν δύο είδη υποδοχέων της ACTH: ένας με χημική συγγένεια  $KD = 1nM$  αλλά μόνο περίπου 60 ανά κύτταρο και ένας ακόμη με  $KD = 300nM$ , αλλά περίπου 600.000 ανά κύτταρο. Η ύπαρξη υποδοχέων υψηλής και χαμηλής συγγένειας ACTH σημαίνει πως οι ιστοί είναι ευαίσθητοι όχι μόνο στην παρουσία της ACTH, αλλά και στη συγκέντρωσή της.

### B. Κλινική εφαρμογή

Υπερβολική συγκέντρωση ACTH μπορεί να οδηγήσει σε υπερπαραγωγή κορτιζόλης η οποία μπορεί να προκαλέσει σύνδρομο Cushing. Η υπερβολική συγκέντρωση ACTH μπορεί να προκληθεί από καλοήθεις αδένωμα της υπόφυσης. Άλλες αιτίες του συνδρόμου Cushing (υπερβολική συγκέντρωση κορτιζόλης) περιλαμβάνουν την έκτοπη παραγωγή ACTH, η οποία απαντάται σε ορισμένους όγκους των πνευμόνων και σε καλοήθεις επινεφριδιακούς όγκους. Η συνηθέστερη αιτία του συνδρόμου Cushing είναι η εξωγενής πρόσληψη γλυκοκορτικοειδών.


Στα συμπτώματα του συνδρόμου Cushing περιλαμβάνονται κεντρική παχυσαρκία, ατροφία άκρων, πανσεληνοειδές πρόσωπο, συσσωρευση λίπους στον αυχένα, λέπτυνση του δέρματος, επιρρέπεια στη δημιουργία εκχυμώσεων, μυική αδυναμία, υπέρταση, αρτηριοσκληρίωση, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, οίδημα, διαταραχές εμμηνου ρήσεως, ψυχολογικές διαταραχές, οστεοπόρωση, ευαισθησία στις λοιμώξεις και κακή επούλωση των τραυμάτων.

Η ελαττωμένη έκκριση ACTH από την υπόφυση ονομάζεται δευτεροπαθής επινεφριδιακή ανεπάρκεια. Τριτοπαθής επινεφριδιακή ανεπάρκεια προκαλείται από την αδυναμία του υποθαλάμου να παράγει κορτικοεκλυτίνη (CRH) ενώ ως πρωτοπαθής επινεφριδιακή ανεπάρκεια ορίζεται η απώλεια επινεφριδιακών ορμονών εξαιτίας καταστροφής ή ανεπάρκειας του επινεφριδιακού φλοιού. Όλοι οι ασθενείς με επινεφριδιακή ανεπάρκεια παρουσιάζουν απώλεια βάρους. Μέρος της διάγνωσης της δευτεροπαθούς και της τριτοπαθούς επινεφριδιακής ανεπάρκειας αποτελεί η αναζήτηση της διέγερσης παραγωγής κορτιζόλης μετά από έγχυση ACTH (Cortrosyn).

#### IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η DIAsource ACTH-IRMA είναι μια ανοσοραδιομετρική εξέταση δύο βημάτων που βασίζεται στο διαχωρισμό σε επιστρωμένο σωληνάριο. Επιτρέπει τον προσδιορισμό της άθικτης ανθρώπινης φλοιοτρόπου ορμόνης (ACTH) σε πλάσμα EDTA. Η κάτω και έσω επιφάνεια των πλαστικών σωληνάρων έχει επιστρωθεί με μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για το κλάσμα 1-24 της ACTH (κλάσμα άκρου N). Βαθμονομητές ή δείγματα προστίθενται στα σωληνάρια. Μετά από επώαση 2 ωρών, απομακρύνονται με πλύση τυχόν περίσσεια αντιγόνου, κλάσματα μέσης περιοχής και άκρου C. Προστίθενται σημασμένα με <sup>125</sup>I πολυκλωνικά αντισώματα, ειδικά για το κλάσμα 24-39 της ACTH (κλάσμα άκρου C).. Μετά από επώαση 1 ώρας και πλύση, η παραμείνουσα καθηλωμένη στο σωληνάριο ραδιενέργεια αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση της άθικτης ACTH.

#### V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 εξετάσεων	Ανασύσταση			
 Σωληνάρια επιστρωμένα με Αντι ACTH (μονοκλωνικά αντισώματα)	2 x 48	Έτοιμο για χρήση			
<table border="1" data-bbox="92 779 300 813"> <tr> <td>Ab</td> <td>125I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: Αντι-ACTH (πολυκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με <sup>125</sup> Ιωδίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια ορολευκωματίνη και αζίδιο (<0,1%)	Ab	125I	CONC	1 φιαλίδιο 0,650 ml 890 kBq	Αραιώστε 21 x με ρυθμιστικό διάλυμα (βλ ενότητα VII. C).
Ab	125I	CONC			
<table border="1" data-bbox="103 974 288 1008"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Ρυθμιστικό διάλυμα: διάλυμα βορικού με ορό προβάτου, EDTA και αζίδιο (<0.1%)	TRACER	BUF	1 φιαλίδιο 11 ml	Έτοιμο για χρήση	
TRACER	BUF				
<table border="1" data-bbox="114 1108 245 1142"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο πλάσμα, θυμόλη και βενζαμιδίνη	CAL	0	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημ ένο	Προσθέστε 5 ml διαλύματος ανασύστασης	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="114 1220 245 1254"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Βαθμονομητής N = 1 έως 6 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο πλάσμα, θυμόλη και βενζαμιδίνη	CAL	N	6 φιαλίδια λυοφιλοποιημ ένο	Προσθέστε 1 ml διαλύματος ανασύστασης	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="103 1377 288 1411"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Διάλυμα ανασύστασης: διάλυμα βορικού με EDTA και αζίδιο του νατρίου (< 0.1%)	REC	SOLN	1 φιαλίδιο 15 ml	Έτοιμο για χρήση	
REC	SOLN				
<table border="1" data-bbox="167 1489 336 1523"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Διάλυμα επώασης: Διάλυμα φωσφορικών με βόεια λευκωματίνη και αζίδιο (<0.1%)	INC	BUF	1 φιαλίδιο 6 ml	Έτοιμο για χρήση	
INC	BUF				
<table border="1" data-bbox="103 1601 288 1635"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Διάλυμα πλύσης (Tween - NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 φιαλίδιο 40 ml	Αραιώστε 20 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="114 1724 277 1758"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Υλικά ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	CONTROL	N	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημ ένο	Προσθέστε 1 ml διαλύματος ανασύστασης	
CONTROL	N				

**Σημείωση:** 1. Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.  
2. 1 pg του δικού μας παρασκευάσματος αναφοράς είναι ισοδύναμο με 1 pg NIBSC 74/555.

#### VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Πιπέτες για διανομή: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml και 3 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)

3. Αναμείκτης στροβιλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (400rpm)
6. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
7. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
8. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απαριθμητής ακτίνων γ με δυνατότητα μέτρησης του <sup>125</sup>I (ελάχιστη απόδοση 70%).

#### VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές:** Πραγματοποιήστε την ανασύσταση του μηδενικού βαθμονομητή με 5 ml διαλύματος ανασύστασης και των βαθμονομητών 1-6 με 1 ml.
- B. Υλικά ελέγχου:** Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 1 ml διαλύματος ανασύστασης.
- C. Ιχνηθέτης:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος ιχνηθέτη προσθέτοντας 50 µl Αντι-ACTH-<sup>125</sup>I σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Χρησιμοποιήστε αναμεικτη στροβιλισμού για να ομογενοποιήσετε.
- D. Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 19 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (20x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

#### VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου είναι πολύ ασταθείς. Χρησιμοποιήστε τους αμέσως μετά από την ανασύσταση, ψύξτε αμέσως σε κλάσματα και διατηρήστε σε -20°C για 7 εβδομάδες.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία -20° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

#### IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Πρέπει να χρησιμοποιείται EDTA πλάσμα και να τηρούνται οι συνθήκες προφυλάξεις φλεβοπαρακέντησης.
- Μετά τη συλλογή, τα δείγματα πρέπει να τοποθετούνται αμέσως σε πάγο ή σε προηγουμένως ψυχθέντα σωληνάρια. Διαχωρίστε αμέσως σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (2-8°C). Αν δεν εξεταστούν αμέσως (εντός μιας ώρας) μεταφέρετε το υπερκείμενο πλάσμα σε κατάλληλα σημασμένο πλαστικό δοχείο αποθήκευσης και καταψύξτε στους -70°C ή περισσότερο για έως και 45 ημέρες.
- Τα δείγματα ενδέχεται να μην παραμείνουν σταθερά αν διατηρηθούν στους -20°C.
- Μην χρησιμοποιείτε αιμολυμένα ή λιπιδαιμικά δείγματα.

#### X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

##### A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό ανάλωσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφυγείτε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

##### B. Διαδικασία

1. Σημάνετε τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα, υλικό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των συνολικών μετρήσεων, σημάνετε 2 φυσιολογικά σωληνάρια.
2. Στροβίλιστε για λίγο βαθμονομητές, δείγματα και υλικά ελέγχου και διανείμετε 200 µl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
3. Διανείμετε 50 µl από το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης σε κάθε σωληνάριο, εκτός από εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ("total").

- Αναδεύστε τη βάση στήριξης που περιέχει τα σωληνάρια απαλά με το χέρι για να απελευθερωθούν τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα..
- Επωάστε επί 120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 400 rpm.
- Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
- Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
- Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις).
- Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
- Διανείμετε 100 μl ιχνηθέτη σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια για τις μετρήσεις του ιχνηθέτη <sup>125</sup>I ("total").
- Αναδεύστε τη βάση στήριξης που περιέχει τα σωληνάρια απαλά με το χέρι για να απελευθερωθούν τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
- Επωάστε επί 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 400 rpm.
- Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
- Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
- Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις).
- Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
- Υποβάλλετε σε μέτρηση τα σωληνάρια σε απεριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

#### XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της ACTH (τετημημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
- Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε υλικό ελέγχου και δείγμα με παρεμβολή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

#### XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως επεξήγηση και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

ACTH-IRMA		cpm	B/T (%)
Συνολική μέτρηση		273476	100
Βαθμονομητής	0,0 pg/ml	418	0,2
	9,6 pg/ml	1580	0,6
	31,2 pg/ml	3836	1,4
	97,2 pg/ml	10839	4,0
	295,4 pg/ml	27691	10,1
	1006,4 pg/ml	64156	23,5
	1931,9 pg/ml	93486	34,2

#### XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

##### A. Όριο ανίχνευσης

Υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση τριών τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες καταμετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 1.16 pg/ml.

##### B. Ειδικότητα

Πίθανά παρεμβαλλόμενα πεπτιδία προστέθηκαν σε πλάσμα EDTA χαμηλού και υψηλού επιπέδου ACTH. Μετρήθηκε η φαινομενική απόκριση ACTH.

Αναλύμενη ουσία που προστέθηκε σε πλάσμα EDTA χαμηλού επιπέδου ACTH	Παρατηρημένο επίπεδο ACTH (pg/ml)	Αναλύμενη ουσία που προστέθηκε σε πλάσμα EDTA μέσου επιπέδου ACTH	Παρατηρημένο επίπεδο ACTH (pg/ml)
Τίποτα	0,9	Τίποτα	34,5
ACTH κλάσμα 1-17	0,8	ACTH κλάσμα 1-17	25,0
ACTH κλάσμα 18-39	7,1	ACTH κλάσμα 18-39	33,5
ACTH αρουραίου	364,7	ACTH αρουραίου	450,0
αMSH	1,8	αMSH	31,6
βMSH	0,9	βMSH	33,0
β-ενδορφίνη	1,1	β-ενδορφίνη	32,8

Αυτό αποδεικνύει ότι ο προσδιορισμός IRMA για ACTH δεν παρουσιάζει διασταυρούμενη αντίδραση με κλάσματα της ACTH, αMSH, βMSH, και β-ενδορφίνης. Παρουσιάζει ωστόσο διασταυρούμενη αντίδραση με την ACTH αρουραίου στο 39%.

##### Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)
A	19	17,5 ± 1,1	6,4	D	15	29,6 ± 1,4	4,8
B	20	69,3 ± 2,1	3,0	E	15	121,9 ± 7,5	6,2
C	20	386,7 ± 15,1	3,9				

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

##### Δ. Ορθότητα

###### ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Προσθεθείσα ACTH (pg/ml)	Ανακτηθείσα ACTH (pg/ml)	Ανάκτηση (%)
1100,0	1128,0	102,5
550,0	552,5	100,5
275,0	273,8	99,6
137,5	149,0	108,4

###### ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
2	1/64	7,8	7,4
	1/1	-	348,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

##### E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν ορθά ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 30 λεπτά μετά την προσθήκη των βαθμονομητών στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ				
	0'	10'	20'	30'
C1	546,1	563,9	563,4	568,9
C2	86,6	88,7	89,0	85,9
C3	44,4	44,4	42,9	43,2
C4	122,4	123,0	122,6	121,0

#### ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγμα EDTA πλάσματος με συγκέντρωση ACTH της τάξης των 69000 pg/ml δίνει σήμα πάνω από την υψηλότερη συγκέντρωση του βαθμονομητή.

#### XIV. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Δείγματα από ασθενείς που έχουν λάβει παρασκευάσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού για σκοπούς διάγνωσης ή θεραπείας, ενδεχομένως να περιέχουν ανθρώπινα αντισώματα αντι-ποντικού (HAMA). Σε αυτά τα δείγματα μπορούν να παρατηρηθούν ψευδώς αυξημένες ή ψευδώς μειωμένες τιμές, όταν ελέγχονται με kit προσδιορισμού που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού.
- Τα ετεροφιλικά αντισώματα στον ανθρώπινο ορό μπορούν να αντιδράσουν με ανοσοσφαιρίνες των αντιδραστηρίων, προκαλώντας παρεμβολή σε in vitro ανοσοπροσδιορισμούς. Ασθενείς που εκτίθενται τακτικά σε ζώα ή προϊόντα ζωικού ορού ενδεχομένως να είναι επιρρεπείς σε αυτήν την παρεμβολή. Παθολογικές τιμές μπορούν να παρατηρηθούν σε παρουσία ετεροφιλικών αντισωμάτων. Αξιολογείτε με προσοχή τα αποτελέσματα ασθενών, στους οποίους υπάρχει υποψία αυτών των αντισωμάτων. Εάν τα αποτελέσματα δεν είναι σύμφωνα με άλλες κλινικές παρατηρήσεις, θα χρειαστεί η λήψη περαιτέρω πληροφοριών πριν από τη θέση της διάγνωσης.

#### XV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για το υλικό ελέγχου 1 ή/και το υλικό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου, τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα. Μην καταψύχετε-αποψύχετε περισσότερο από δύο φορές.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

#### XVI. ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές παρέχονται πιο κάτω μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών. Το πεδίο τιμών των επιπέδων της ACTH σε 47 φυσιολογικούς ασθενείς, εκφρασμένο ως ποσοστό επί τοις εκατό 5% έως 95%, ήταν 9,6 έως 49,7 pg/ml.

#### XVII. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

##### Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το kit αυτό περιέχει το <sup>125</sup>I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσότοπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και αναλωσίμα γάντια.

#### XVIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- SMITH IA, FUNDER JW.  
**Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.**  
Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.
- LUMPKIN MD.  
**The regulation of ACTH secretion by IL-1.**  
Science 1987; 238:452-454.
- MILLER WL.  
**Molecular biology of steroid hormones synthesis.**  
Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.
- FRASER NL.  
**Storage of biological sample.**  
NASA Cr- 1967; 781.
- RAFF H.  
**Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.
- GOVERDE HJ.  
**Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson's syndrome.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.
- GOVERDE HJ.  
**The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.**  
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.
- LAMBERT A.  
**On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.**  
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.
- KRIEGER DT.  
**Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.
- KRIEGER DT.  
**Physiopathology of Cushing's disease.**  
Endocrine Review. 1983; 4:22-43.
- GANONG WF.  
**ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.**  
N Engl J Med. 1974; 290-1006.

**XIX. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ**

	<b>ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ (μl)</b>	<b>ΒΑΘΜΟΝΟ ΜΗΤΕΣ (μl)</b>	<b>ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) Υλικά ελέγχου (μl)</b>
Βαθμονομητές (0-6)	-	200	-
Δείγματα, Υλικά ελέγχου	-	-	200
Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	-	50	50
Επώαση	120 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση στις 400 rpm		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας	-	Αναρρόφηση 2,0 ml	
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας	-	Αναρρόφηση 2,0 ml	
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση	
Ιχνηθέτης	100	100	100
Επώαση	60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση στις 400 rpm		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας	-	Αναρρόφηση 2,0 ml	
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας	-	Αναρρόφηση 2,0 ml	
Διαχωρισμός	-	Αναρρόφηση	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		



pl

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

## ACTH-IRMA

### I. PRZEZNACZENIE

Zestaw do oznaczenia immunoradiometrycznego do ilościowego pomiaru ludzkiego hormonu adrenokortykotropowego (Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH)) w osoczu pobranym na EDTA metodą *in vitro*.

### II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa firmowa: DIAsource ACTH-IRMA Kit
- B. Numer katalogowy: KIP0061: 96 oznaczeń
- C. Wyprodukowano przez: DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

**Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:**

**Tel: +32 (0)10 84.99.11**

**Fax: +32 (0)10 84.99.91**

### III. INFORMACJE KLINICZNE

#### A. Aktywność biologiczna

Hormon adrenokortykotropowy (ACTH lub kortykotropina) jest hormonem polipeptydowym syntetyzowanym (z POMC, pro-opiomelanokortyny) z kortykotropów w płacie przednim gruczołu przysadkowego, w odpowiedzi na hormon uwalniający kortykotropinę (corticotrophin-releasing hormone (CRH)) wydzielany przez podwzgórze. Składa się z 39 aminokwasów o masie cząsteczkowej 4540 Da.

ACTH reguluje syntezę steroidów, która zachodzi w korze nadnerczy. ACTH stymuluje wydzielanie kortyzolu z nadnerczy. Kortyzol i inne glikokortykosterydy zwiększają wytwarzanie glukozy, hamują syntezę białek i zwiększają katabolizm białkowy, stymulują lipolizę i hamują odpowiedź immunologiczną i zapalną. Kortyzol indukuje inwolucję grasicy, co powoduje obniżenie prawidłowego funkcjonowania grasicy, co częściowo odpowiada za ograniczenie odpowiedzi układu immunologicznego. Glikokortykosterydy pomagają utrzymać ciśnienie tętnicze i stanowią podstawowy składnik odpowiedzi organizmu na stres. Wydzielanie ACTH jest regulowane przez hormon uwalniający kortykotropinę (CRH) i wazopresynę (ADH). Kortyzol hamuje zwrotnie przysadkę i podwzgórze, obniżając poziomy ACTH i CRH. W warunkach podstawowych (bez działania stresu), kortyzol jest wydzielany w wyraźnym rytmie okołodobowym ze zwykłą poziomą wcześniej rano i późno po południu. W warunkach stresu, zmienność dobową jest zaburzona.

Wpływ na inne gruczoły oprócz nadnerczy: ACTH stymuluje wydzielanie MSH (hormonu melanotropowego) i GH (hormonu wzrostu), nasila lipolizę w komórkach tłuszczowych (adipocytach) i indukuje odruchy neurologiczne (takie jak przeciąganie się i ziewanie). Większość z tych działań jest związana z pochodzeniem substancji od POMC. Lipoliza indukowana przez ACTH jest znacznie słabsza niż przez lipotropinę (LPH). ACTH jest prekursorem  $\alpha$ -MSH.

W korze nadnerczy istnieją dwa rodzaje receptorów ACTH, jeden o średnicy 1 nM, który występuje w ilości zaledwie 60 na jedną komórkę oraz drugi o średnicy 300 nM, który występuje w ilości 600 000 na komórkę. Występowanie receptorów o wysokim i niskim powinowactwie dla ACTH oznacza, że tkanki są wrażliwe nie tylko na występowanie ACTH, ale również na jego stężenie.

#### B. Zastosowania kliniczne

Zbyt duża ilość ACTH może prowadzić do nadprodukcji kortyzolu, który może doprowadzić do zespołu Cushing'a. Zbyt duża ilość ACTH może wynikać z obecności niezłośliwego gruczolaka przysadki. Do innych przyczyn zespołu Cushinga (zbyt duża ilość kortyzolu) może zaliczać się ektopowa produkcja ACTH, występująca w niektórych złośliwych guzach płuc oraz w łagodnych i złośliwych guzach nadnerczy. Najczęstszą przyczyną zespołu Cushinga jest egzogenne przyjmowanie glikokortykosterydów.

Do objawów zespołu Cushinga należy otyłość brzuszna, chude kończyny, twarz księżycy w pełni, bawoli kark, cienka skóra, łatwo tworzące się siniaki, osłabienie, nadciśnienie tętnicze, miażdżycy, zastoinowa niewydolność serca, obrzęki, zaburzenia miesiączkowania, zaburzenia psychiczne, osteoporoza, zakażenia i słabe gojenie się ran.


Obniżone wydzielanie ACTH przez przysadkę nazywane jest wtórną niedocznością nadnerczy. Trzeciorzędowa niedoczność nadnerczy związana jest z niewydolnością podwzgórza do produkcji hormonu uwalniającego kortykotropinę (CRH), podczas gdy niedoczność pierwotna jest zdefiniowana jako utrata hormonów kory nadnerczy, związana ze zniszczeniem lub zaburzeniami kory nadnerczy. Wszyscy pacjenci z niewydolnością kory nadnerczy wykazują utratę masy ciała. Wtórna i trzeciorzędowa niewydolność kory nadnerczy jest częściowo zdiagnozowana przez podanie ACTH (Cotrosyn) i obserwację stymulacji wytwarzania kortyzolu.

#### IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

DIAsource ACTH-IRMA jest dwuetapowym oznaczeniem immunoradiometrycznym, opartym na separacji w opłaszczonych probówkach. Pozwala na oznaczenie nienaruszonego ludzkiego hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) w osoczu pobranym na EDTA. Przeciwciała monoklonalne swoiste do fragmentu (N-końcowego) 1-24 ACTH są dołączone do dolnej wewnętrznej powierzchni probówek plastikowych. Do probówek są dodawane kalibratory lub próbki. Po 2 godzinach inkubacji, płukanie usuwa przypadkowy nadmiar antygenu, fragmenty środkowe i C-końcowe.

Dodawane są przeciwciała poliklonalne znakowane <sup>125</sup>I, swoiste do fragmentu ACTH 24-39 (fragment C-końcowy). Po 1 godzinnej inkubacji i płukaniu, radioaktywność pozostałych cząstek związanych z powierzchnią probówki odzwierciedla stężenie ACTH.

#### V. DOSTARCZONE ODCZYNNIKI

Odczynniki	Ilość 96 oznaczeń	Rekonstytucja			
 Probówki opłaszczone przeciwciałami anti-ACTH (przeciwciała monoklonalne)	2 x 48	Gotowe do zastosowania			
<table border="1" data-bbox="76 810 284 846"> <tr> <td>Ab</td> <td><sup>125</sup>I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Anti-ACTH- <sup>125</sup> I (przeciwciała poliklonalne) w buforze fosforanowym z albuminą bydlęcą i azydkiem sodowym (<0,1%)	Ab	<sup>125</sup> I	CONC	1 fiołka 0,650 ml 890 kBq	Rozcieńczyć 21x buforem znacznikowym (jak w rozdziale VII. C)
Ab	<sup>125</sup> I	CONC			
<table border="1" data-bbox="92 945 268 981"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Bufor znacznikowy: Bufor boranowy zawierający surowicę owczą, EDTA i azydek (<0,1%)	TRACER	BUF	1 fiołka 11 ml	Gotowe do zastosowania	
TRACER	BUF				
<table border="1" data-bbox="108 1079 252 1115"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Kalibrator zerowy w plazma ludzkiej zawierający tymol i benzamidynę	CAL	0	1 fiołka liofil.	Dodać 5 ml roztworu do rekonstytucji	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="108 1191 252 1227"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibratory 1-6 w plazma ludzkiej z tymolem i benzamidyną (dokładne wartości na etykietach fiołek)	CAL	N	6 fiołek liofil.	Dodać 1 ml roztworu do rekonstytucji	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="82 1326 277 1361"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Roztwór do rekonstytucji : Bufor boranowy zawierający EDTA i azydek sodowy (<0,1%)	REC	SOLN	1 fiołka 15 ml	Gotowe do zastosowania	
REC	SOLN				
<table border="1" data-bbox="98 1438 261 1473"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Bufor do inkubacji: Bufor fosforanowy z albuminą bydlęcą i azydkiem (<0,1%)	INC	BUF	1 fiołka 6 ml	Gotowe do zastosowania	
INC	BUF				
<table border="1" data-bbox="82 1550 309 1585"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Roztwór płuczący (Tween 20-NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 fiołka 40 ml	Rozcieńczyć 20x wodą destylowaną (wykorzystać mieszało magnetyczne).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="82 1684 284 1720"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontrolne 1 i 2 w plazma pochodzenia ludzkiego z tymolem	CONTROL	N	2 fiołek liofil.	Dodać 1 ml roztworu do rekonstytucji	
CONTROL	N				

**Uwaga:** 1. Do rozcieńczeń surowic należy stosować kalibrator zerowy.  
2. 1 pg preparatu kalibratora jest równoważne do 1 pg of NIBSC 74/555.

#### VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

1. Woda destylowana
2. Pipety do dostarczania objętości: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml i 3 ml. (zaleca się stosowanie właściwych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
3. Mieszało wirowe
4. Mieszało magnetyczne

5. Wytrząsarka probówek (400 obr/min)
6. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
7. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
8. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru <sup>125</sup>I (minimalny uzysk 70%).

#### VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Kalibratory:** Rozpuścić kalibrator zerowy za pomocą 5 ml roztworu do rekonstytucji a inne kalibratory za pomocą 1 ml roztworu do rekonstytucji.
- B. Kontrole:** Rozpuścić kontrole przy pomocy 1 ml roztworu do rekonstytucji.
- C. Znacznik:** Przygotować odpowiednią objętość roztworu znacznikowego, dodając 50 µl przeciwciał Anti-ACTH-<sup>125</sup>I do 1 ml buforu znacznikowego. W celu homogenizacji należy wykorzystać mieszało wirowe (wortex).
- D. Roboczy roztwór płuczący:** Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować dodając 19 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczającego (20x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszało magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczający należy wylać pod koniec dnia.

#### VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Kalibratory i kontrole są bardzo nietrwałe, należy je wykorzystać zaraz po rozpuszczeniu lub od razu zamrozić w niewielkich objętościach, przechowując w temperaturze -20°C do maksymalnie 7 tygodni. Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiołce w temperaturze od -20°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie

#### IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Należy wykorzystywać osocze pobrane na EDTA i przestrzegać zasad związanych z nakłuciem żył.
- Próbkę należy pobierać i natychmiast umieszczać w lodzie lub pobierać do wcześniej schłodzonych probówek. Od razu rozdzielać w chłodzonej wirówce (2-8°C). Jeżeli próbka nie jest oznaczona od razu (w ciągu jednej godziny), należy usunąć supernatant osocza do wcześniej oznakowanego plastikowego naczynia i zamrozić w temperaturze -70°C lub niższej, do 45 dni.
- Próbkę mogą nie zachować trwałości, jeżeli będą przechowywane w temperaturze -20°C.
- Nie należy wykorzystywać próbek zhemolizowanych lub lipemicznych.

#### X. PROCEDURA

##### A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności. Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.

Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste, jednorazowe końcówki pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji. Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

##### B. Procedura

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone probówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 standardowe probówki.
2. Krótco wirować kalibratory, próbki kontrolne i badane, a następnie dozować po 200 µl każdej substancji do odpowiednich probówek.
3. Dozować 50 µl buforu do inkubacji do każdej probówki, z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania.
4. Delikatnie potrząsać (ręcznie) stojak z probówkami, aby uwolnić wszelkie uwieszone pęcherzyki powietrza.
5. **Inkubować** przez 2 godziny w temperaturze pokojowej w wytrząsarce probówek (400 obrotów na minutę).

6. Aspirować zawartość każdej próbki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). Upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbki, aby usunąć cały płyn.
7. **Plukać** próbki 2 ml roztworu do płukania (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). W trakcie dodawania roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
8. Aspirować zawartość każdej próbki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania).
9. **Plukać** ponownie próbki 2 ml roztworu do płukania (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania).
10. **Po** ostatnim płukaniu, pozostawić próbki odwrócone przez 2 minuty, a następnie aspirować pozostałe krople płynu.
11. **Dozować** 100 µl znacznika anty- $ACTH-^{125}I$  do każdej próbki, w tym również do nieopłaszczonych próbek do całkowitego zliczania.
12. Delikatnie **potrząsać** (ręcznie) stojak z próbkami, aby uwolnić wszelkie uwięzione pęcherzyki powietrza.
13. **Inkubować** przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w wytrząsarce próbek (400 obrotów na minutę).
14. **Aspirować** zawartość każdej próbki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). Upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbki, aby usunąć cały płyn.
15. **Plukać** próbki 2 ml roztworu do płukania (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). W trakcie dodawania roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
16. Aspirować zawartość każdej próbki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania).
17. **Plukać** ponownie próbki 2 ml roztworu do płukania (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania).
18. **Po** ostatnim płukaniu pozostawić próbki odwrócone przez 2 minuty, a następnie aspirować pozostałe krople płynu.
19. Zliczać próbki w liczniku gamma przez 60 sekund.

#### XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
2. kratkę wykreślić c.p.m. (rzędna) dla każdego kalibratora wobec odpowiadającego stężenia CT (odcietą) oraz wykreślić krzywą kalibracji przez punkty kalibratora, odrzucając oczywiste wartości odbiegające od linii środkowej.
3. Odczytać stężenie dla każdej kontroli i próbki przez naniesienie na krzywą kalibracyjną.
4. Redukcja danych przy pomocy komputera pozwoli uprościć te obliczenia. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.

#### XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

ACTH-IRMA		cpm	B/T (%)
Zliczanie całkowite		273476	100
Kalibrator	0,0 pg/ml	418	0,2
	9,6 pg/ml	1580	0,6
	31,2 pg/ml	3836	1,4
	97,2 pg/ml	10839	4,0
	295,4 pg/ml	27691	10,1
	1006,4 pg/ml	64156	23,5
	1931,9 pg/ml	93486	34,2

#### XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

##### A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów. Granica wykrywania, zdefiniowana jako przybliżone stężenie trzech odchyłań standardowych ponad przeciętną ilość zliczeń na poziomie wiązania zerowego, wynosiła 1,16 pg/ml.

##### B. Swoistość

Do osocza pobranego na EDTA, zawierającego wysoki i niski poziom ACTH, dodano możliwe peptydy interferujące. Oznaczano przybliżoną odpowiedź ACTH.

Analityt dodany do osocza EDTA zawierającego ACTH w niskim stężeniu	Obserwowany poziom ACTH (pg/ml)	Analityt dodany do osocza EDTA zawierającego ACTH w średnim stężeniu	Obserwowany poziom ACTH (pg/ml)
Nic	0,9	Nic	34,5
fragment 1-17 ACTH 100000 pg/ml	0,8	fragment 1-17 ACTH 100000 pg/ml	25,0

fragment 18-39 ACTH 100000 pg/ml	7,1	fragment 18-39 ACTH 100000 ng/ml	33,5
Szczurzy ACTH 1000 pg/ml	364,7	Szczurzy ACTH 1000 pg/ml	450,0
$\alpha$ MSH 100000 pg/ml	1,8	$\alpha$ MSH 100000 pg/ml	31,6
$\beta$ MSH 100000 pg/ml	0,9	$\beta$ MSH 100000 pg/ml	33,0
$\beta$ Endorfina 100000 pg/ml	1,1	$\beta$ Endorfina 100000 pg/ml	32,8

Dane świadczą o tym, że ACTH-IRMA nie reaguje krzyżowo z fragmentami ACTH,  $\alpha$ MSH,  $\beta$ MSH i  $\beta$ Endorfiny, natomiast reaguje krzyżowo ze szczurzym ACTH w 39 %.

#### C. Precyzja

W SERII				POMIĘDZY SERIAMI			
Surowica	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Surowica	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	19	17,5 ± 1,1	6,4	D	15	29,6 ± 1,4	4,8
B	20	69,3 ± 2,1	3,0	E	15	121,9 ± 7,5	6,2
C	20	386,7 ± 15,1	3,9				

SD Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

#### D. Dokładność

BADANIE ODZYSKU			
Próbka	Kalcytonina dodana (pg/ml)	Stęż. zmierzone (pg/ml)	Odzysk (%)
1	1100,0	1128,0	102,5
	550,0	552,5	100,5
	275,0	273,8	99,6
	137,5	149,0	108,4

BADANIE ROZCIĘCZENIA			
Próbka	Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (pg/ml)	Stęż. zmierzone (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,4
2	1/1	-	348,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy kalibratora zerowego.

#### E. Opóźnienie czasowe

Jak pokazano w tym miejscu i poniżej, wyniki oznaczenia pozostają dokładne nawet wtedy, kiedy próbka jest dozowana po 30 minutach po dodaniu kalibratora do opłaszczonych próbek.

	0'	10'	20'	30'
C1	546,1	563,9	563,4	568,9
C2	86,6	88,7	89,0	85,9
C3	44,4	44,4	42,9	43,2
C4	122,4	123,0	122,6	121,0

#### F. Efekt hook'a

Próbka osocza pobranego na EDTA, zawierająca ACTH w stężeniu 69000 pg/ml, daje sygnał przekraczający najwyższe stężenie kalibratora.

#### XIV. OGRANICZENIA

- Próbki od pacjentów, którzy w celach diagnostycznych lub terapeutycznych otrzymywali preparaty z mysich przeciwciał monoklonalnych, mogą zawierać ludzkie przeciwciała anty-mysie (HAMA). Próbki takie, oznaczone z użyciem zestawów testowych

wykorzystujących mysie przeciwciała monoklonalne, mogą wykazywać wartości fałszywie zawyżone lub zaniżone.

- Przeciwciała heterofilne w ludzkiej surowicy mogą reagować z immunoglobulinami odczynnika, interferując z oznaczeniami immunologicznymi przeprowadzanymi *in vitro*. Pacjenci rutynowo ekspozycyjni na zwierzęta lub produkty z surowic zwierzęcych mogą wykazywać skłonność do takich interferencji i w razie obecności przeciwciał heterofilnych występować mogą u nich nieprawidłowe wyniki testów. Wyniki oznaczeń próbek od pacjentów z takimi przeciwciałami należy interpretować z ostrożnością. Jeżeli wyniki nie są zgodne z obserwacjami klinicznymi, przed postawieniem rozpoznania powinny być uzyskane dodatkowe informacje.

#### XV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiolki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach. Nie wolno zamrażać i rozmrażać więcej niż jeden raz.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

#### XVI. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych, każde laboratorium powinno opracować własne wartości referencyjne. Zakres poziomów ACTH u 47 zdrowych pacjentów, wyrażonych jako grupa od 5% do 95% percentyla, wynosił od 9,6 do 49,7 pg/ml.

#### XVII. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

##### **Bezpieczeństwo**

Tylko do diagnostyki *in vitro*. Zestaw zawiera <sup>125</sup>I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35.5 keV). Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie płyny z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anti-HCV, anti-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydłace pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

#### XVIII. BIBLIOGRAFIA

1. SMITH IA, FUNDER JW.

#### **Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.**

Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.

2. LUMPKIN MD.  
**The regulation of ACTH secretion by IL-1.**  
Science 1987; 238:452-454.
3. MILLER WL.  
**Molecular biology of steroid hormones synthesis.**  
Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.
4. FRASER NL.  
**Storage of biological sample.**  
NASA Cr- 1967; 781.
5. RAFF H.  
**Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.
6. GOVERDE HJ.  
**Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson's syndrome.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.
7. GOVERDE HJ.  
**The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.**  
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.
8. LAMBERT A.  
**On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.**  
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.
9. KRIEGER DT.  
**Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.
10. KRIEGER DT.  
**Physiopathology of Cushing's disease.**  
Endocrine Review. 1983; 4:22-43.
11. GANONG WF.  
**ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.**  
N Engl J Med. 1974; 290-1006.

**XIX. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU**

	<b>CALKOWITA LICZBA ZLICZEŃ μl</b>	<b>KALIBRATORY μl</b>	<b>PRÓBKA(I) KONTROLE μl</b>
Kalibratory (0-6)	-	200	-
Próbki, kontrole	-	-	200
Bufor do inkubacji	-	50	50
Inkubacja	2 godziny w temperaturze pokojowej ze wstrząsaniem z prędkością 400 obr/min		
Rozdzielenie	-	aspiracja	
Roztwór płuczący	-	2,0 ml	
Rozdzielenie	-	aspiracja	
Roztwór płuczący	-	2,0 ml	
Rozdzielenie	-	aspiracja	
Znacznik	100	100	100
Inkubacja	1 godzina w temperaturze pokojowej ze wstrząsaniem z prędkością 400 obr/min		
Rozdzielenie	-	aspiracja	
Roztwór płuczący	-	2,0 ml	
Rozdzielenie	-	aspiracja	
Roztwór płuczący	-	2,0 ml	
Rozdzielenie	-	aspiracja	
Zliczanie	Zliczanie próbek przez 60 sekund		



bu

Прочетете целия протокол преди употреба

## ACTH-IRMA

### I. УПОТРЕБА

Кит за имунорадиометричен анализ за количествено определяне ин витро на човешкия адреноркортикотропен хормон (ACTH) в палзма с Етилендиамин тетраоцетна киселина (EDTA).

### II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентовано име: DIAsource ACTH-IRMA Kit
- B. Каталоген номер: KIP0061: 96 теста
- C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:  
Тел.: +32 (0)10 84.99.11 Факс: +32 (0)10 84.99.91

### III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

#### A. Биологична активност

Адреноркортикотропният хормон (ACTH или кортикотрофин) е полипептиден хормон, синтезиран (от POMC – проопиомеланокортин) и отделян от кортикотрофите в предната част на хипофизната жлеза в отговор на хормона кортикотропин-освобождаващ хормон (CRH), освобождаван от хипоталамуса. Състои се от 39 аминокиселини с молекулно тегло от 4540 Da. ACTH регулира синтеза на стероиди от надбъбречната кора и стимулира отделянето на кортизол от надбъбречните жлези. Кортизолът и други гликостероиди повишават производството на глюкоза, спират синтеза на протеини и повишават разлагането им, стимулират липолизата и оказват влияние върху имунологичните и възпалителни реакции. Кортизолът предизвиква инволюция на тимуса, което е понижаване на нормалното действие на тимуса, което от части обяснява способността му да намалява реакциите на имунната система. Гликокортикоидите спомагат за поддържане на кръвното налягане и са основен компонент при реагирането на тялото на стрес. Отделянето на ACTH се регулира от кортикотропин-освобождаващ хормон (CRH) и антидиуретичния хормон, наричан още вазопресин (ADH). Кортизолът се връща до хипофизата и хипофаламуса, за да подтисне нивата на ACTH и CRH. При нормални (нестресови) условия, кортизолът се отделя с ясно изразен денонощен ритъм, с високи нива рано сутрин и с ниски нива вечер. При стресови условия денонощното изменение е притъпено.

Несвързани с надбъбречните жлези ефекти: ACTH стимулира освобождаването на MSH (меланоцит-стимулиращ хормон) и GH (хормон на растежа), повишава липолизата в мастните клетки (адипоцити) и предизвиква неврологични ефекти (като протягане и прозяване). Това има връзка с факта, че е синтезиран от POMC. Липолизата, предизвикана от ACTH е доста по-слаба в сравнение с тази от липотропина (LPH – липотропен хормон). ACTH е прекурсор на  $\alpha$ -MSH.

В надбъбречната кора има два вида рецептори за ACTH, единият с  $KD = 1nM$ , но само около 60 на клетка, докато другият има  $KD = 300 nM$ , но с около 600,000 на клетка. Наличието на високо и ниско-афинитетни рецептори за ACTH означава, че тъканите са чувствителни не само към ACTH, но и към неговата концентрация.

#### B. Клинично прилагане

Прекалено голямо наличие на ACTH може да доведе до прекомерно отделяне на кортизол, което от своя страна може да причини синдром на Кушинг. Голямото количество на ACTH може да бъде причинено от доброкачествен тумор на хипофизата. Синдромът на Кушинг (прекалено много кортизол) се причинява и от ектопично произвеждане на ACTH, срещано при някои белодробни тумори, както и при доброкачествени и злокачествени тумори на надбъбречните жлези. Най-често срещаната причина за причиняване на синдрома на Кушинг е екзогенното поемане на гликостероиди.

Симптомите на синдрома на Кушинг включват затлъстяване около коремната област, крайно изтощение, лунообразно лице, биволска гърбица, изтъняване на кожата, податливост към охлузвания, слабост в мускулите, хипертензия, артеросклероза, конгестивна сърдечна недостатъчност, едема, нередовна менструация, физиологични смущения, остеопороза, повишени инфекции и бавно зарастващи рани.

Пониженото отделяне на ACTH от хипофизата се нарича вторична надбъбречна недостатъчност. Третична надбъбречна недостатъчност се причинява когато хипофаламусът не произвежда кортикотропин-освобождаващ хормон (CRH), докато първичната надбъбречна недостатъчност се определя като загуба на адреноркортикални хормони, поради унищожаване или нараняване на надбъбречната кора. При всички пациенти, страдащи от надбъбречна недостатъчност се наблюдава загуба на тегло. Вторичната и третичната надбъбречна недостатъчност от части се диагностицира с инжекция от ACTH (Кортизол), като се търси симулация на произвеждане на кортизол.

#### IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

DIAsource АСТН-IRMA е двуетапен имунорадиметричен анализ, базиран на сепарация на покрити епруветки. Той позволява определянето на цялостния адреноркотропни хормон (АСТН) в плазма с EDTA. Моноклонални антитела, характерни за 1-24 АСТН фрагмента (N-терминален фрагмент) се прикрепват към долната и вътрешната повърхност на пластмасовите епруветки. Към тях се добавят калибратори или проби. След двучасова инкубация чрез измива се отстранява случайния излишък на антигена, средните и C-терминални фрагменти. Добавят се поликлоналните антитела, маркирани с <sup>125</sup>I, характерни за 24-39 АСТН фрагмента (C-терминален фрагмент). След едночасова инкубация и след измиване, остатъчната радиоактивност, свързана с епруветката, отразява концентрацията на цялостния АСТН.

#### V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Кит за анализ <sup>96</sup>	Приготвяне
Епруветки, покрити с анти-АСТН (моноклонални антитела)	2 x 48	Готов за употреба
Ab <sup>125</sup> I CONC Анти-АСТН- <sup>125</sup> I (поликлонални антитела) във фосфатен буфер с волски серумен албумин и натриев азид (<0.1%)	1 флакон 0,650 ml 890 kBq	Разтваря се 21x с Маркиращ буфер (вж. Раздел VII. C)
TRACER BUF Маркиращ буфер: Боратен буфер с овчи серум, EDTA и азид (<0,1%)	1 флакон 11 ml	Готов за употреба
CAL 0 Нулев Калибратор: в човешки плазма с тимол и бендаמיד	1 флакон лиофилизирани	Добавете 5 ml възстановителен разтвор
CAL N Калибратори 1-6 в човешки плазма с тимол и бендаמיד. Виж точните стойности на етикетите на флаконите.	6 флакона лиофилизирани	Добавете 1 ml възстановителен разтвор
REC SOLN Възстановителен разтвор: Боратен буфер с EDTA и натриев азид (<0.1%)	1 флакон 15 ml	Готов за употреба
INC BUF Инкубационен буфер: Фосватен буфер с волски албумин и азид (<0,1%)	1 флакон 6 ml	Готов за употреба
WASH SOLN CONC Измиващ разтвор (NaCl-Tween 20)	1 флакон 40 ml	Разредете 20x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
CONTROL N Контроли 1 и 2 в човешки плазма с тимол	2 флакона лиофилизирани	Добавете 1 ml Пресъздаващ разтвор (РЕКОНСТИТУИРАЩ РАЗТВОР)

Забележка: 1. Използвайте нулевия калибратор за серумните разреждания.  
2. 1 pg от калибраторния препарат се равнява на 1 pg от NIBSC 74/555

#### VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

1. Дестилирана вода
2. Пипети от: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml и 3 ml (препоръчва се използването на прецизни пипети с крайници за еднократна употреба).
3. Завихрящ смесител

4. Клатещо устройство за епруветки (400 оборота в минута)
5. Магнитен сепаратор
6. 5 ml автоматична спринцовка (тип Cornwall) за измиване
7. Аспирационна система (по избор).
8. Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество <sup>125</sup>I (минимален капацитет от 70%)

#### VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

- Калибратори:** Реконституирайте нулевия калибратор с 5 ml Пресъздаващ разтвор (РЕКОНСТИТУИРАЩ РАЗТВОР), а останалите калибратори с 1 ml реконституиращ разтвор.
- Контроли:** Реконституирайте контролите с 1 ml реконституиращ разтвор.
- Маркиране :** пригответе достатъчен обем Маркиращ разтвор като добавите 50 µl от Анти-АСТН-<sup>125</sup>I към 1 ml от Маркиращия буфер. Използвайте вортекс, за да хомогенизирате.
- Работен измиващ разтвор:** Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 19 обема дестилирана вода към 1 обем от измиващия разтвор (20x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете употребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.

#### VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- Калибраторите и контролите са твърде нестабилни, използвайте ги непосредствено след реконституирането, замразете ги веднага в аликвоти и ги съхранявайте при -20°C в продължение на 7 седмици.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Прясно приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След първата употреба, трейсера е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури -20°C.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

#### IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Трябва да се използва EDTA плазма, като се вземат обичайните предпазни мерки при венопункция.
- Трябва да се съберат образци и веднага да се поставят в лед или да се изтеглят в предварително охладени епруветки. Веднага разделете в охладена центрофуга (2-8°C). Ако не се вземат проби за анализ веднага (в рамките на един час), отстранете останалата на повърхността плазма в подходящо надписан пластмасов съд за съхранение и замразете при -70°C или по-ниска температура за срок не по-дълъг от 45 дни.
- Образците може да не останат стабилни, ако се съхраняват при -20°C.
- Не използвайте хемолизирани или липемични образци.

#### X. ПРОЦЕДУРА

- Общи бележки**  
Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партиди китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура. Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен крайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба. Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрили точността. Съобразявайте се с времето за инкубация. Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.
- Процедура**
  1. Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
  2. Разбъркайте за кратко калибраторите, пробите и контролите върху вортекс и разпределете 200 µl от всеки от тях в съответните епруветки.
  3. Разпределете 50 µl инкубационен буфер във всяка епруветка с изключение на тези за общи измервания.

- Внимателно разклатете с ръка поставката с епруветките, за да освободите евентуални въздушни мехури в тях.
- Инкубирайте за 2 часа при стайна температура в клатещо устройство за епруветки (400 оборота в минута).
- Аспирирайте съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
- Изплакнете епруветките с 2 ml от Измивания разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте. Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измиващ разтвор.
- Аспирирайте съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси).
- Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измивания разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте.
- Оставете епруветките в изправено положение за две минути и аспирирайте останалите капки течност.
- Разпределете 100 µl от анти-АСТН-<sup>125</sup>I трейсер във всяка епруветка, включително и в епруветките без покритие за общия брой импулси.
- Внимателно разклатете с ръка поставката с епруветките, за да освободите евентуални въздушни мехури в тях.
- Инкубирайте за 60 минути при стайна температура в клатещо устройство за епруветки (400 оборота в минута).
- Аспирирайте съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
- Изплакнете епруветките с 2 ml от Измивания разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте. Избягвайте получаването на пяна по време на добавянето на Работния измиващ разтвор.
- Аспирирайте съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси).
- Изплакнете отново епруветките с 2 ml от Измивания разтвор (освен епруветките за определяне на общия брой импулси) и аспирирайте.
- Оставете епруветките в изправено положение за две минути и аспирирайте останалите капки течност.
- Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

#### XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветките.
- Нанесете (на ординатата) броят на минута за всеки калибратор (общ брой импулси в минута) спрямо (на абсцисата) съответната концентрация на АСТН и начертайте калибрационна крива през калибрационните точки като не включвате точките, които очевидно не принадлежат към тази крива.
- Прочетете концентрациите за всяка контрола и проба чрез интерполиране върху калибрационната крива.
- Тези изчисления могат да се улеснят чрез асистирано редуциране на данните посредством компютър. Ако се използва автоматична обработка на резултатите, се препоръчва прилагането на 4-параметрова логистична функционална крива.

#### XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

АСТН-IRMA		срп	ВТ (%)
Общ брой		273476	100
Калибратор	0,0 pg/ml	418	0,2
	9,6 pg/ml	1580	0,6
	31,2 pg/ml	3836	1,4
	97,2 pg/ml	10839	4,0
	295,4 pg/ml	27691	10,1
	1006,4 pg/ml	64156	23,5
	1931,9 pg/ml	93486	34,2

#### XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

##### A. Определен лимит

Дванадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Лимитът на откриване, определен като явната

концентрация три стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване е 1.16 pg/ml.

##### B. Специфичност

Евентуално пречещи пептиди се добавени към плазма EDTA с ниско и високо ниво на АСТН. Измерено и явната реакция на АСТН.

Добавен анализиран материал към EDTA плазма с ниско ниво на АСТН	Наблюдено ниво на АСТН (pg/ml)	Добавен анализиран материал към EDTA плазма със средно ниво на АСТН	Наблюдено ниво на АСТН (pg/ml)
Нищо	0,9	Нищо	34,5
АСТН 1-17 фрагмента 100000 pg/ml	0,8	АСТН 1-17 фрагмента 100000 pg/ml	25,0
АСТН 18-39 фрагмента 100000 pg/ml	7,1	АСТН 18-39 фрагмента 100000 pg/ml	33,5
АСТН от плъх 1000 pg/ml	364,7	АСТН от плъх 1000 pg/ml	450,0
αMSH 100000 pg/ml	1,8	αMSH 100000 pg/ml	31,6
βMSH 100000 pg/ml	0,9	βMSH 100000 pg/ml	33,0
β-ендорфин 100000 pg/ml	1,1	β-ендорфин 100000 pg/ml	32,8

Това показва, че АСТН-IRMA не дава кръстосана реакция с фрагментите АСТН, αMSH, βMSH и β-ендорфина, но дава кръстосана реакция с АСТН от плъх при 39%.

##### C. Прецизност

###### ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО

Серум	N	<X>±S.D. pg/ml	CV (%)	Серум	N	<X>±S.D. pg/ml	CV (%)
A	19	17,5 ± 1,1	6,4	D	15	29,6 ± 1,4	4,8
B	20	69,3 ± 2,1	3,0	E	15	121,9 ± 7,5	6,2
C	20	386,7 ± 15,1	3,9				

SD : Стандартно отклонение; CV: Коэффициент на вариация

##### D. Точност

###### ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

Проба	Разреждане	Теоретична концентрация (pg/ml)	Измерена концентрация (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,4
2	1/1	-	348,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Пробите са били разредени с нулев калибратор.

###### ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ

Проба	Добавен АСТН (pg/ml)	Възстановен АСТН (pg/ml)	Възстановяване (%)
1	1100,0	1128,0	102,5
	550,0	552,5	100,5
	275,0	273,8	99,6
	137,5	149,0	108,4

##### E. Изместване във времето

Както е показано по-долу, резултатите от анализиранияте проби остават точни, дори и когато се приготвя проба 30 минути след добавянето на калибратора към покрити епруветки.

	0'	10'	20'	30'
C1	546,1	563,9	563,4	568,9
C2	86,6	88,7	89,0	85,9
C3	44,4	44,4	42,9	43,2
C4	122,4	123,0	122,6	121,0

#### F. Ефект на кукичката

Проба от плазма EDTA с концентрация на АСТН 69000 pg/ml дава резултат над най-високата концентрация на калибратора.

#### XIV. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Проби от пациенти, които са приели препарати от миши моноклонални антитела за диагностика или лечение, могат да съдържат човешки анти-миши антитела (НАМА). Тези проби могат да покажат или фалшиво повишени, или намалени стойности, когато се тестват с китове, които използват миши моноклонални антитела.
  - Хетерофилните антитела в човешкия серум могат да реагират с реагентните имуноглобулини, смущавайки ин витро имуногестовите. Пациенти, рутинно изложени на животни или на продукти от животински серум, могат да бъдат предразположени към тези смущения и могат да се наблюдават аномални стойности в случай на наличие на хетерофилни антитела. Внимателно преценявайте резултатите на пациенти, за които има подозрения, че имат от тези антитела.
- Ако резултатите не са съвместими с други клинични наблюдения, ще се изисква допълнителна информация преди поставяне на диагноза.

#### XV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни проби, които трябва да се съхраняват замразени в кратни съотношения.
- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лабораторна Практика.

#### XVI. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

Стойностите, показани по-долу, са предоставени само за напътствие; всяка лаборатория трябва да установи свои собствен нормален обхват на стойности. Диапазонът от различни нива на АСТН при 47 нормални пациенти, изразени като криви на разпределение 5% - 95%, е 9,6 – 49,7 pg/ml.

#### XVII. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

##### Безопасност

Само за *in vitro* диагностика. Този набор съдържа <sup>125</sup>I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35,5 keV) лъчения. Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; поупкмата, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни. Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радиоизотопи. Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита. Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това,

че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените проби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност. Всички животински продукти и деривати са били събирани от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекциозни. Избягвайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди. Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

#### XVIII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. SMITH IA, FUNDER JW. **Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.** *Endocrin Rev.* 1988; 9:159-179.
2. LUMPKIN MD. **The regulation of ACTH secretion by IL-1.** *Science* 1987; 238:452-454.
3. MILLER WL. **Molecular biology of steroid hormones synthesis.** *Endocrin Rev.* 1988; 9:295-318.
4. FRASER NL. **Storage of biological sample.** *NASA Cr-* 1967; 781.
5. RAFF H. **Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995; 80:1036-1039.
6. GOVERDE HJ. **Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson's syndrome.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1993; 77:443-447.
7. GOVERDE HJ. **The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.** *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 1989; 31:255-265.
8. LAMBERT A. **On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.** *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 1985; 23:253-261.
9. KRIEGER DT. **Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1979; 48:566-571.
10. KRIEGER DT. **Physiopathology of Cushing's disease.** *Endocrine Review.* 1983; 4:22-43.
11. GANONG WF. **ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.** *N Engl J Med.* 1974; 290:1006.

**XIX.      ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА**

	<b>ОБЩА АКТИВНОСТ</b> µl	<b>КАЛИБРАТОРИ</b> µl	<b>ПРОБА (И) КОНТРОЛИ</b> µl
Калибратори (0-6) проби, контроли Инкубационен буфер	- - -	200 - 50	- 200 50
Инкубация	2 часа при стайна температура с разклащане 400 оборота в минута		
Сепарация Измиващ разтвор Сепарация Измиващ разтвор Сепарация	- - - - -	Аспирирайте 2 ml аспирирайте 2 ml аспирирайте	
Трейсър	100	100	100
Инкубация	60 минути при стайна температура с разклащане 400 оборота в минута		
Сепарация Измиващ разтвор Сепарация Измиващ разтвор Сепарация	- - - - -	аспирирайте 2 ml аспирирайте 2 ml аспирирайте	
Броене	Отчетете епруветките за 60 секунди		

Тщательно ознакомиться перед использованием.

## АСТН-IRMA

### I. ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Комплект количественного радиоиммунного анализа для *in vitro* количественных измерений человеческого адренкортикотропного гормона (АСТН) в плазме ЭДТА.

### II. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

- A. **Патентованное название:** DIAsource АСТН-IRMA Kit
- B. **Номер по каталогу:** KIP0061: 96 тестов
- C. **Изготовитель:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За технической консультацией или по оформлению заказа обращаться:

Тел: +32 (0)10 84.99.11

Факс: +32 (0)10 84.99.91

### III. КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА

#### A. Биологическая активность

Адренкортикотропный гормон (АСТН или кортикотропин) является синтезированным полипептидным гормоном (из проопиомеланокортина), который секретизирован из кортикотропов передней доли придатка мозга благодаря гормону кортикотропин-релизинг фактора (CRH), выделяемого гипоталамусом. Состоит из 39 аминокислот. Молекулярный вес 4540 Да.

АСТН регулирует синтез стероидов коры надпочечников. АСТН стимулирует секрецию кортизола из надпочечников. Кортизол и другие глюкокортикоиды увеличивают выработку глюкозы, замедляют синтез протеина и усиливают расщепление протеинов, стимулируют расщепление жиров и влияют на иммунологическую и воспалительную реакцию. Кортизол индуцирует регрессию тимуса, функция которого, в свою очередь, отвечает за возможность ослабления реагирования иммунной системы. Глюкокортикоиды помогают поддерживать кровяное давление и формировать достаточное количество компонентов реагирования тела на стресс. Секреция АСТН регулируется кортикотропин-релизинг гормоном (CRH) и вазопрессинном (ADH). Кортизол воздействует на гипофиз и гипоталамус для подавления уровней АСТН и CRH. При исходных условиях (отсутствие стресса) кортизол вырабатывается в нормальном циркадном ритме: более высокие утренние уровни и более низкие вечерние. В условиях стресса циркадный ритм сбивается.

Опосредованные эффекты на надпочечных железах: АСТН стимулирует выделение MSH (меланотропина) и СТГ (гормон роста), усиливает расщепление жиров в жировых клетках (адипоцитах) и индуцирует неврологические эффекты (например, потягивание и зевоту). Множество функций следует из его проопиомеланокортиновой природы. Расщепление жиров с помощью адренкортикотропного гормона происходит гораздо слабее, чем расщепление с помощью липотропина (LPH). АСТН является прекурсором  $\alpha$ -MSH.

В коре надпочечников имеется два типа рецепторов АСТН: один с  $KD = 1\text{pM}$ , но только 60 на клетку, в то время как у другого  $KD = 300\text{pM}$ , но примерно 600 000 на клетку. Присутствие рецепторов высокого и низкого сродства для АСТН означает, что ткани чувствительны не только к присутствию АСТН, но и к его концентрации.

## ***В. Клиническое применение***

Переизбыток АСТН может привести к избыточному выработыванию кортизола, что способно повлечь синдром Кушинга. Переизбыток АСТН может возникнуть из-за аденомы гипофиза в легкой форме. Другими причинами синдрома Кушинга (переизбыток кортизола) может стать эктопическое выработывание АСТН, что наблюдается иногда при опухоли легких, а также легкие и злокачественные формы опухоли надпочечников. Наиболее частой причиной синдрома Кушинга является экзогенное попадание глюкокортикоидов внутрь.

К симптомам синдрома Кушинга относятся тункальное ожирение, крайнее истощение, лунообразное лицо, "бычий горб", истончение кожи, образование гематом, мышечная слабость, гипертония, атеросклероз, застойная сердечная недостаточность, отечность, нарушение менструальных циклов, психологические расстройства, остеопороз, сокращение сопротивляемости инфекциям и плохое заживление ран.


Пониженная секреция АСТН гипофизом называется вторичной недостаточностью надпочечников. Третичная недостаточность надпочечников возникает из-за прекращения выработывания гипоталамусом кортикотропин-рилизинг-гормона (CRH), но при этом первичная недостаточность надпочечников определяется как утеря гормонов коры надпочечников из-за разрушения или нарушения функции коры надпочечников. У всех пациентов, страдающих недостаточностью коры надпочечников, отмечается потеря веса. Вторичная и третичная недостаточность коры надпочечников в некоторой мере диагностируется инъекцией АСТН (Cortrosyn) и наблюдением за симуляцией выработывания кортизола.

#### IV. НА ЧЕМ ОСНОВАН МЕТОД

DIASource АСТН-IRMA представляет собой двухступенчатый количественный радиоиммунный анализ на основе сепарации в окрашенной пробирке. Метод позволяет выявить интактный адренкортикотропный гормон человека (АСТН) в плазме ЭДТА. Моноклональные антитела, присущие фрагменту 1-24 АСТН (N-концевой фрагмент), крепятся на нижней внутренней поверхности пластиковой пробирки. В пробирку добавляются калибраторы или образцы. После 2 часов инкубации промывкой удаляются случайные излишки антигена, среднегормональные и C-концевые фрагменты.

Добавляются поликлональные антитела <sup>125</sup>I, относящиеся к фрагментам 24-39 АСТН (C-концевой фрагмент). После часа инкубации и промывки радиоактивные остатки, налипшие на пробирку, отражают интактные АСТН концентрации.

#### V. РЕАГЕНТЫ В КОМПЛЕКТЕ

Реагенты	Кол-во 96 тестов	Раствор для разбавления			
 Пробирки, покрытые анти-АСТН (моноклональные)	2 x 48	Готово к использованию			
<table border="1" data-bbox="76 786 284 831"> <tr> <td>Ab</td> <td><sup>125</sup>I</td> <td>КОНЦН</td> </tr> </table> Анти-АСТН- <sup>125</sup> I (поликлональные антитела) в фосфатном буфере, бычий альбумин и азид натрия (<0.1%)	Ab	<sup>125</sup> I	КОНЦН	1 флакон 0,650 мл 890 кБк	Развести 21х индикаторный буфер (см. раздел VII. С)
Ab	<sup>125</sup> I	КОНЦН			
<table border="1" data-bbox="81 958 268 1003"> <tr> <td>МАРКЕР</td> <td>БУФ</td> </tr> </table> Индикаторный буфер: Боратный буфер с овечьей сывороткой, ЭДТА и азидом (<0.1%)	МАРКЕР	БУФ	1 флакон 11 мл	Готово к использованию	
МАРКЕР	БУФ				
<table border="1" data-bbox="103 1099 245 1144"> <tr> <td>КАЛ</td> <td>0</td> </tr> </table> Нулевой калибратор в человеческой плазме, тимол и бензамидин	КАЛ	0	1 флакон лиофил.	Добавить 5 мл растворителя	
КАЛ	0				
<table border="1" data-bbox="103 1211 245 1256"> <tr> <td>КАЛ</td> <td>№</td> </tr> </table> Калибраторы 1-6 в человеческой плазме, тимол и бензамидин (см. точные данные на этикетке)	КАЛ	№	6 флакона лиофил.	Добавить 1 мл растворителя	
КАЛ	№				
<table border="1" data-bbox="81 1346 268 1391"> <tr> <td>ВСТ.</td> <td>РАСТ</td> </tr> </table> Восстанавливающий раствор: Боратный буфер с ЭДТА и азидом натрия (<0.1%)	ВСТ.	РАСТ	1 флакон 15 мл	Готово к использованию	
ВСТ.	РАСТ				
<table border="1" data-bbox="81 1458 268 1503"> <tr> <td>ИНК.</td> <td>БУФ.</td> </tr> </table> Инкубационный буфер: Фосфатный буфер, бычий альбумин и азид (<0.1%)	ИНК.	БУФ.	1 флакон 6 мл	Готово к использованию	
ИНК.	БУФ.				
<table border="1" data-bbox="81 1570 304 1637"> <tr> <td>ПРОМ БВ.</td> <td>РАСТВ Р.</td> <td>КОНЦ НТРТ.</td> </tr> </table> Промывочный раствор (Твин 20-NaCl)	ПРОМ БВ.	РАСТВ Р.	КОНЦ НТРТ.	1 флакон 40 мл	Растворить 20 х дистиллированной водой (использовать магнитный смеситель)
ПРОМ БВ.	РАСТВ Р.	КОНЦ НТРТ.			
<table border="1" data-bbox="81 1704 284 1749"> <tr> <td>КОНТРОЛ</td> <td>№</td> </tr> </table> Контрольные маркеры 1 и 2 в человеческой плазме с тимолом	КОНТРОЛ	№	2 флакона лиофил.	Добавить 1 мл растворителя	
КОНТРОЛ	№				

Примечания: 1. Для разбавления сыворотки использовать нулевой калибровочный маркер.  
2. 1 пг приготовления калибратора эквивалентно 1 пг НИБСК 74/555

#### VI. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Необходимы следующие материалы, отсутствующие в комплекте поставки:

1. Дистиллированная вода
2. Пипетки для отмеривания: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 мл и 3 мл. (рекомендуется использовать точные дозаторы со сменными пластиковыми наконечниками)

3. Вортекс-миксер
4. Магнитный смеситель
5. Шейкер для пробирок (400 об/мин)
6. Шприц-автомат 5 мл (тип "корнуол") для промывки
7. Аспирационная система (любая)
8. Можно использовать любой гамма-счетчик с чувствительностью до <sup>125</sup>I (мин. производительность 70%).

#### VII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТА

- Калибраторы:** Разбавить нулевой калибратор 5 мл раствора, а другие калибраторы - 1 мл раствора.
- Контрольные образцы:** Разбавить контрольные образцы в 1 мл дистиллированной воды.
- Маркер:** Приготовить достаточное количество раствора маркера, добавив 50 µl анти-АСТН-<sup>125</sup>I на 1 мл буфера маркера. Используя вортексный смеситель, тщательно перемешать.
- Рабочий промывочный раствор:** Приготовить достаточный объем рабочего раствора, добавив 19 объемов дистиллированной воды к 1 объему промывочного раствора (20х). Использовать магнитный смеситель для смешивания. Рабочую промывочную жидкость в конце для слить.

#### VIII. СРОК ГОДНОСТИ И ХРАНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

- В закупоренном исходном состоянии все компоненты в комплекте стабильны до завершения срока годности, указанного на этикетке, при условии хранения от 2 до 8°C.
- Калибраторы и контрольные образцы обладают низкой стабильностью. Использовать немедленно после разведения. Заморозить немедленно и хранить в аликвотах не более 7 недель при T -20°. - Избегать последующих циклов размораживания и замораживания.
- Свежеприготовленный рабочий раствор для промывки следует использовать в тот же день.
- После первого использования маркер остается стабильным до истечения срока годности при условии хранения в оригинальном герметичном флаконе при T -20°C.
- Физические изменения внешнего вида реагентов могут указывать на нестабильность или разрушение.

#### IX. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Следует использовать ЭДТА-плазму. При венопункции соблюдать обычные меры предосторожности.
- Образцы отобрать и поместить немедленно на лед или в предварительно охлажденные пипетки. Немедленно сепарировать в охлажденной центрифуге (2-8°C). Если анализ не осуществляется немедленно (в течение часа), удалить отстоянную плазму в тщательно маркированный пластиковый сосуд и хранить замороженной при T -70°C и ниже до 45 дней.
- При температуре -20°C образцы становятся неустойчивыми.
- Не допускается использовать гемолизированные или липемические образцы.

#### X. ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ

- Обращение**  
Запрещается использовать компоненты в комплекте после истечения срока годности. Запрещается смешивать материалы из разных комплектов поставки. До начала пользования довести температуру реагентов до комнатной.  
Тщательно перемешать все реагенты и образцы умеренным взбалтыванием. Во избежание перекрестного загрязнения рекомендуется использовать чистые одноразовые наконечники к пипетке для добавления реагента и образца.  
Для большей точности рекомендуется использовать высокоточные пипетки или автоматизированное капельное оборудование. Соблюдать инкубационный период.  
Подготовить градуировочную кривую для каждого сеанса. Не допускается использование данных предыдущего сеанса.

#### V. Порядок действий

1. Пометить окрашенные пробирки контрольного повтора для каждого калибратора, образца и контрольного образца. Для общего подсчета маркировать 2 обычные пробирки
2. Взболтать калибраторы, образцы и контрольные маркеры, и поместить 200 µl каждого в соответствующую пробирку.

- Поместить 50 µl инкубационного буфера в каждую пробирку за исключением предназначенных для суммарного подсчета.
- Умеренно встряхнуть штатив с пробирками вручную для удаления пузырьков воздуха.
- Выдержать 2 минуты при комнатной температуре на шейкере для пробирок (400 об/мин).
- Продуть воздухом содержимое каждой пробирки (за исключением суммарного подсчета). Убедиться, что пластиковый наконечник аспиратора достигает донца окрашенной пробирки, и вся жидкость удалена.
- Промыть пробирки 2 мл промывочного раствора (за исключением суммарного подсчета). Избегать вспенивания при добавлении рабочего промывочного раствора.
- Продуть воздухом содержимое каждой пробирки (за исключением суммарного подсчета).
- Снова промыть пробирки 2 мл промывочного раствора (за исключением суммарного подсчета) и продуть воздухом.
- После последней промывки оставить пробирки в вертикальном положении на две минуты. Затем продуть оставшуюся влагу.
- Добавить 100 µl маркера анти-АСТН-<sup>125</sup>I в каждую пробирку, включая неокрашенные, для общего подсчета.
- Умеренно встряхнуть штатив с пробирками вручную для удаления пузырьков воздуха.
- Выдержать 1 минуту при комнатной температуре на шейкере для пробирок (400 об/мин).
- Продуть воздухом содержимое каждой пробирки (за исключением суммарного подсчета). Убедиться, что пластиковый наконечник аспиратора достигает донца окрашенной пробирки, и вся жидкость удалена.
- Промыть пробирки 2 мл промывочного раствора (за исключением суммарного подсчета). Избегать вспенивания при добавлении рабочего промывочного раствора.
- Продуть воздухом содержимое каждой пробирки (за исключением суммарного подсчета).
- Снова промыть пробирки 2 мл промывочного раствора (за исключением суммарного подсчета) и продуть воздухом.
- После последней промывки оставить пробирки в вертикальном положении на две минуты. Затем продуть оставшуюся влагу.
- Осуществить подсчет в пробирках гамма-счетчиком в течение 60 секунд.

## XI. ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТА

- Рассчитать средний показатель контрольного анализа.
- построить график ц/мин (ордината) для каждого калибратора против соответствующей концентрации АСТН (абсцисса) и начертить градуировочную кривую через градуировочные точки. Очевидными провалами или всплесками значений можно пренебречь.
- Считать показатели концентрации для каждого контрольного маркера и образца за счет интерполяции на градуировочной кривой.
- Автоматизированное сведение данных упростит подсчет. Если используется автоматическая обработка результатов, рекомендуется воспользоваться 4-параметрическим логистическим способом припасовывания кривой.

## XII. ТИПОВЫЕ ДАННЫЕ

Следующие данные представлены исключительно для иллюстрации. Не допускается их использование когда-либо вместо градуировочной кривой, отображающей реальное время.

АСТН-IRMA		ц/мин.	В/Т (%)
Общий счет		273476	100
Калибратор	0,0 пг/мл	418	0,2
	9,6 пг/мл	1580	0,6
	31,2 пг/мл	3836	1,4
	97,2 пг/мл	10839	4,0
	295,4 пг/мл	27691	10,1
	1006,4 пг/мл	64156	23,5
	1931,9 пг/мл	93486	34,2

## XIII. ХАРАКТЕРИСТИКИ

### A. Порог обнаружения

Исследовалось двадцать нулевых калибраторов совместно с другими калибраторами. Порогом обнаружения, заявленным как эффективная концентрация, три стандартных отклонения выше средних показателей при нулевом связывании, был показатель 1,16 пг/мл.

### B. Специфичность

В ЭДТА-плазму с высоким и низким уровнем АСТН были добавлены потенциально интерферирующие пептиды. Измерялась эффективная АСТН-реакция

К нижнему добавлено исследуемое вещество АСТН уровень в ЭДТА-плазме	Наблюдавшийся уровень АСТН (пг/мл)	К среднему добавлено исследуемое вещество АСТН уровень в ЭДТА-плазме	Наблюдавшийся уровень АСТН (пг/мл)
Ничего	0,9	Ничего	34,5
Фрагмент АСТН 1-17100000 пг/мл	0,8	Фрагмент АСТН 1-17100000 пг/мл	25,0
Фрагмент АСТН 18-39100000 пг/мл	7,1	Фрагмент АСТН 18-39100000 пг/мл	33,5
Мышиный АСТН 1000 пг/мл	364,7	Мышиный АСТН 1000 пг/мл	450,0
αMSH 100000 пг/мл	1,8	αMSH 100000 пг/мл	31,6
βMSH 100000 пг/мл	0,9	βMSH 100000 пг/мл	33,0
β-эндорфин 100000 пг/мл	1,1	β-эндорфин 100000 пг/мл	32,8

Из таблицы видно, что АСТН-IRMA не дает перекрестную реакцию с фрагментами АСТН, αMSH, βMSH и β-эндорфина, но перекрестно реагирует с мышиным АСТН при 39%.

### C. Точность

ВНУТРИАНАЛИТИЧЕСКАЯ МЕЖАНАЛИТИЧЕСКАЯ

Сыворотка	№	<X> ± Ст. Откл. (пг/мл)	К.В. (%)	Сыворотка	№	<X> ± Ст. Откл. (пг/мл)	К.В. (%)
A	19	17,5 ± 1,1	6,4	D	15	29,6 ± 1,4	4,8
B	20	69,3 ± 2,1	3,0	E	15	121,9 ± 7,5	6,2
C	20	386,7 ± 15,1	3,9				

С.О.: Стандартное отклонение; К.В.: Коэффициент вариации

### D. Точность

ТЕСТ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ

Образец	Добавленный АСТН (пг/мл)	Восстановленный АСТН (пг/мл)	Восстановление (%)
1	1100,0	1128,0	102,5
	550,0	552,5	100,5
	275,0	273,8	99,6
	137,5	149,0	108,4

ПРОБА НА РАЗБАВЛЕНИЕ

Образец	Разбавление	Теоретич. концентр. (пг/мл)	Измеренная концентр. (пг/мл)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,4
2	1/1	-	348,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,6	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Образцы разбавлялись нулевым калибратором.

#### Е. Задержка

Как показано ниже, результаты исследования остаются точными, даже когда образец разбавляется через 30 минут после добавления калибратора в окрашенные пробирки.

	0'	10'	20'	30'
C1	546,1	563,9	563,4	568,9
C2	86,6	88,7	89,0	85,9
C3	44,4	44,4	42,9	43,2
C4	122,4	123,0	122,6	121,0

#### Ф. Хук-эффект

Образец ЭДТА-плазмы с концентрацией АСТН 69000 пг/мл сигнализирует, когда концентрация выше концентрации калибратора.

#### XIV. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Материалы, взятые у пациента, получавшего препараты моноклональных антител мыши для диагностики или терапии, могут содержать человеческие антимышьи антитела (НАМА). Такие образцы в результате тестирования с применением комплекта для анализов, содержащего мышьные моноклональные антитела, могут давать как ошибочно завышенные, так и заниженные показатели.
- Нейтрофильные антитела в человеческой сыворотке могут взаимодействовать с реагентом иммуноглобулина, препятствующим нормальному иммунологическому анализу *in vitro*. Пациенты, обычно принимающие продукты, полученные из животных или сыворотки животных, могут быть предрасположены к такому воздействию, и если присутствуют нейтрофильные антитела, не исключаются аномальные показатели. Следует тщательно проверять результаты анализов пациента, у которого, возможно, имеются такие антитела. Если результаты не соответствуют клиническим наблюдениям, тогда для постановки диагноза потребуется дополнительная информация.

#### XV. ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Если результаты, полученные по контрольному образцу 1 и/или 2 находятся за пределами указаний на этикетке, тогда, если отсутствует удовлетворительное объяснение, такие результаты использовать не допускается.
- Каждая лаборатория может создать собственный комплект контрольных образцов, которые следует хранить в аликвотах замороженными.
- Критерием приемлемого на случай расхождений между контрольными результатами по образцам следует считать усредненную лабораторную практику.

#### XVI. РЕФЕРЕНТНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ

Показатели ниже предлагаются исключительно в виде руководства. Каждая лаборатория должна самостоятельно установить свой собственный ряд показателей.

Ряд уровней АСТН у 47 обычных пациентов, выраженный в виде процентов от 5% до 95%, составлял от 9,6 до 49,7 пг/мл.

#### XVII. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

##### Меры безопасности

Только для диагностики *in vitro*.

В этом комплекте находится <sup>125</sup>I (период полураспада: 60 дней), активная ионизирующая X (28 keV) и γ (35.5 keV) радиация.

К обращению с этим радиоактивным продуктом допускаются только уполномоченные лица. Приобретение, хранение, использование и обмен радиоактивных продуктов осуществляется в рамках законодательства страны пользователя. Продукт запрещено применять на людях и животных. Обращение с радиоактивным продуктом осуществляется только в специально подготовленных местах в стороне от оживленных участков деятельности. Лаборатория обязана вести журнал регистрации выдачи и хранения радиоактивных материалов. Загрязненное радиоактивными веществами лабораторное оборудование и стеклянную посуду следует содержать отдельно во избежание перекрестного загрязнения различными радионуклидами.

Любые утечки радиоактивных веществ должны быть немедленно устранены согласно мерам безопасности по обращению с радиоактивными веществами.

Утилизация радиоактивных отходов осуществляется согласно местным предписаниям и указаниям лиц, отвечающих за лабораторию. Соблюдение основных правил безопасности по обращению с радиоактивными веществами обеспечивает должный уровень защиты.

Компоненты человеческой крови, включенные в комплект, тестированы согласно утвержденным европейским методам и/или методике Управления по контролю за продуктами и лекарствами FDA. Они признаны негативными для HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Ни один из известных методов не может гарантировать, что производные человеческой крови не переносят гепатит, СПИД или иные инфекции. Таким образом, с образцами реагента, сыворотки или плазмы следует обращаться согласно местным правилам техники безопасности.

Все продукты животного происхождения отбирались только от здоровых животных. Бычьи компоненты отбираются в странах, где ТГЭ не замечена. Однако компоненты с содержанием животных образцов следует рассматривать как потенциально контагиозные.

Избегать контакта участков оголенной кожи с реагентами (азид натрия в качестве антисептика). Азид в комплекте может реагировать со свинцом и медью на пломбировке и, таким образом, создавать взрывоопасные азиды металлов. На этапе промывки раковину следует обильно промывать большим количеством воды во избежание отложения азидов на стенках. Запрещается курить, пить, принимать пищу или накладывать косметику на рабочем месте. Запрещается осуществлять дозировку ртом. Пользоваться защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

#### XVIII. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. SMITH IA, FUNDER JW.  
**Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.**  
Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.
2. LUMPKIN MD.  
**The regulation of ACTH secretion by IL-1.**  
Science 1987; 238:452-454.
3. MILLER WL.  
**Molecular biology of steroid hormones synthesis.**  
Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.
4. FRASER NL.  
**Storage of biological sample.**  
NASA Cr- 1967; 781.
5. RAFF H.  
**Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.
6. GOVERDE HJ.  
**Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson's syndrome.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.
7. GOVERDE HJ.  
**The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.**  
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.
8. LAMBERT A.  
**On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.**  
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.
9. KRIEGER DT.  
**Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.
10. KRIEGER DT.  
**Physiopathology of Cushing's disease.**  
Endocrine Review. 1983; 4:22-43.
11. GANONG WF.  
**ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.**  
N Engl J Med. 1974; 290-1006.
12. PRIMUS FJ, KELLEY EA, HANSEN HJ, GOLDENBERG DM.  
**Sandwich – Type Immunoassay of Carcinoembryonic Antigen in Patients Receiving Murine Monoclonal Antibodies for Diagnosis and Therapy.**  
Clin Chem 1988;34:261
13. SCHROFF RW, FOON KA, BEATTY SM, OLDHAM RK, MORGAN AC JR  
**Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy.**  
Cancer Res 1985;45:879-85
14. BOSCATO LM, STUART MC.  
**Heterophilic Antibodies: A problem for All Immunoassays**  
Clin Chem 1988; 34(1):27-33

**XIX. СВОДКА ПО ПРОТОКОЛУ**

	<b>ОБЩИЙ СЧЁТ µl</b>	<b>КАЛИБРАТОРЫ µl</b>	<b>ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ) КОНТРОЛЬНЫ Й ОБРАЗЕЦ µl</b>
Калибраторы (0 - 6) Образцы, контрольные образцы Инкубационный буфер	-	200 - 50	- 200 50
Инкубация	2 часа при комнатной Т. Взбалтывание при 400 об/мин		
Сепарация Промывочный раствор Сепарация Промывочный раствор Сепарация	- - - - - -	продукт 2,0 продукт 2,0 продукт	
Маркер	100	100	100
Инкубация	1 часа при комнатной Т. Взбалтывание при 400 об/мин		
Сепарация Промывочный раствор Сепарация Промывочный раствор Сепарация	- - - - - -	продукт 2,0 продукт 2,0 продукт	
Подсчет	Считать пробирки 60 секунд		

Pred použitím si prečítajte celý protokol.

# ACTH-IRMA

## I. ZAMÝŠĽANÝ ÚČEL

Imunorádiometrická testovacia súprava na *in vitro* kvantitatívne meranie ľudského adrenokortikotropného hormónu (ACTH) v plazme EDTA.

## II. VŠEOBECNÉ INFORMÁCIE

- A. **Názov výrobku:** Súprava DIASource ACTH-IRMA
- B. **Katalógové číslo:** KIP0061: 96 testov
- C. **Výrobca:** DIASource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgicko.

**Kontakt v prípade potreby technickej pomoci alebo objednávania:**

**Tel.:** +32 (0)10 84.99.11

**Fax:** +32 (0)10 84.99.91

## III. KLINICKÝ KONTEXT

### A. Biologická aktivita

Adrenokortikotropný hormón (ACTH alebo kortikotropín) je syntetizovaný polypeptidový hormón (z POMC, proopiomelanokortínu), ktorý sa vylučuje z kortikotropov v prednom laloku hypofýzy v reakcii na kortikotropín uvoľňujúci hormón (CRH) uvoľňovaný hypotalámom. Skladá sa z 39 aminokyselín s molekulovou hmotnosťou 4540 Da.

ACTH reguluje syntézu steroidov pomocou kôry nadobličiek. ACTH stimuluje sekréciu kortizolu z nadobličiek. Kortizol a iné glukokortikoidy zvyšujú tvorbu glukózy, inhibujú syntézu bielkovín a zvyšujú odbúravanie bielkovín, stimulujú lipolýzu a ovplyvňujú imunologické a zápalové reakcie. Kortizol indukuje involúciu týmusu, čo je pokles normálnej funkcie týmusu, ktorý čiastočne zodpovedá za jeho schopnosť znižovať odpoveď imunitného systému. Glukokortikoidy pomáhajú udržiavať krvný tlak a tvoria základnú zložku reakcie tela na stres. Sekréciu ACTH reguluje kortikotropín uvoľňujúci hormón (CRH) a vazopresín (ADH). Kortizol sa dostáva späť do hypofýzy a hypotalamu, aby sa potlačili hladiny ACTH a CRH. Pri bazálnych (nestresových) podmienkach sa kortizol vylučuje s výrazným cirkadiánnym rytmom, s vyššími hladinami skoro ráno a nízkymi hladinami neskoro večer. Pri stresových podmienkach je cirkadiánná variácia oslabená.

Účinky sprostredkované inými žľazami ako nadobličkami: ACTH stimuluje uvoľňovanie MSH (melanotropický hormón) a GH (rastový hormón), zvyšuje lipolýzu v tukových bunkách (adipocyty) a vyvoláva neurologické účinky (ako je strečing a zívanie). Väčšina z nich súvisí s jeho pôvodom pochádzajúcim z POMC. Lipolýza spôsobená ACTH je oveľa slabšia ako lipotropín (LPH). ACTH je prekurzorom  $\alpha$ -MSH.

V kôre nadobličiek existujú dva typy ACTH receptorov, jeden s  $KD = 1$  nM, ale len asi 60 v bunke, zatiaľ čo druhý má  $KD = 300$  nM, ale asi 600 000 v bunke. Prítomnosť receptorov s vysokou a nízkou afinitou pre ACTH znamená, že tkanivá sú citlivé nielen na prítomnosť ACTH, ale aj na jeho koncentráciu.

### B. Klinické použitie

Príliš veľké množstvo ACTH môže viesť k nadmernej produkcii kortizolu, čo môže spôsobiť Cushingov syndróm. Príliš veľké množstvo ACTH môže byť spôsobené benígnym adenómom hypofýzy. Medzi ďalšie príčiny Cushingovho syndrómu (príliš veľa kortizolu) patrí ektopická produkcia ACTH, ktorá sa vyskytuje pri niektorých pľúcnych nádoroch a benígnych a malígnych nádoroch nadobličiek. Najčastejšou príčinou Cushingovho syndrómu je exogénne použitie glukokortikoidov.

Príznaky Cushingovho syndrómu zahŕňajú obezitu v oblasti pásu, ochabnutie končatín, opuch tváre, opuch v krčnej časti, stenčenie pokožky, ľahké podliatiny, svalovú slabosť, hypertenziu, artériosklerózu, kongestívne srdcové zlyhanie, edém, nepravidelnú menštruáciu, psychické poruchy, osteoporózu, zvýšený výskyt infekcií a slabé hojenie rán.


Znížená sekrécia ACTH hypofýzou sa nazýva sekundárna adrenálna insuficiencia. Terciárna adrenálna insuficiencia je spôsobená zlyhaním hypotalámu produkovať kortikotropín uvoľňujúceho hormón (CRH), zatiaľ čo primárna adrenálna insuficiencia je definovaná ako strata adrenokortikálnych hormónov v dôsledku deštrukcie alebo poškodenia kôry nadobličiek. Všetci pacienti s adrenálnou insuficienciou vykazujú úbytok hmotnosti. Sekundárna a terciárna adrenálna insuficiencia sa čiastočne diagnostikujú injekčnou aplikáciou ACTH (Cortrosyn) s cieľom zistiť simuláciu produkcie kortizolu.

#### IV. PRINCÍPY METÓDY

DIASource ACTH-IRMA je dvojkrokový imunorádiometrický test založený na separácii pomocou skúmaviek s povrchovou úpravou. Umožňuje stanoviť intaktný ľudský adrenokortikotropný hormón (ACTH) v plazme EDTA. Monoklonálne protilátky špecifické pre fragment 1 – 24 ACTH (N-terminálny fragment) príľnú k spodnému a vnútornému povrchu plastových skúmaviek. Do skúmaviek sa pridajú kalibračné činidlá alebo vzorky. Po 2-hodinovej inkubácii sa premývaním odstráni možný prebytok antigénu, fragmenty strednej časti a C-terminálne fragmenty.

Polyklonálne protilátky označujúce <sup>125</sup>I špecifické pre fragment 24 – 39 ACTH (C-terminálny fragment). Po 1-hodinovej inkubácii a premývaní zvyšná rádioaktivita naviazaná na skúmavku odráža intaktnú koncentráciu ACTH.

#### V. DODANÉ ČINIDLÁ

Činidlá	Množstvo 96 testov	Príprava			
 Skúmavky s povrchovou úpravou antiACTH	2 x 48	Prípravené na použitie			
<table border="1" data-bbox="108 712 304 757"> <tr> <td>Ab</td> <td>125I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Anti-ACTH- <sup>125</sup> I (polyklonálne protilátky) vo fosfátovom pufrí s hovädzím albumínom a azidom sodným (< 0,1 %)	Ab	125I	CONC	1 liekovka 0,650 ml 890 kBq	Zried'te 21x pufrim na sledovanie izotopov (pozri časť VII. C)
Ab	125I	CONC			
<table border="1" data-bbox="108 913 288 958"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Pufer na sledovanie izotopov Borátový pufer s ovčím sérom, EDTA a azidom (< 0,1 %)	TRACER	BUF	1 liekovka 11 ml	Prípravené na použitie	
TRACER	BUF				
<table border="1" data-bbox="108 1048 268 1093"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Nulové kalibračné činidlo v ľudskej plazme s tymolom a benzamidínom	CAL	0	1 liekovka lyofil.	Pridajte 5 ml rekonštitučného roztoku	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="108 1160 268 1205"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibračné činidlá 1 – 6 v ľudskej plazme s tymolom a benzamidínom (pozri presné hodnoty na štítkoch liekoviek)	CAL	N	6 liekoviek lyofil.	Pridajte 1 ml rekonštitučného roztoku	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="108 1317 288 1361"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Rekonštitučný roztok: Borátový pufer s EDTA a azidom sodným (< 0,1 %)	REC	SOLN	1 liekovka 15 ml	Prípravené na použitie	
REC	SOLN				
<table border="1" data-bbox="108 1429 288 1473"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Inkubačný pufer: Fosfátový pufer s hovädzím albumínom a azidom (< 0,1 %)	INC	BUF	1 liekovka 6 ml	Prípravené na použitie	
INC	BUF				
<table border="1" data-bbox="108 1574 325 1619"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Premývací roztok (Tween 20-NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 liekovka 40 ml	Zried'te 20x destilovanou vodou (použite magnetické miešadlo).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="108 1686 288 1731"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontrolné vzorky 1 a 2 v ľudskej plazme s tymolom	CONTROL	N	2 liekovky lyofil.	Pridajte 1 ml rekonštitučného roztoku	
CONTROL	N				

Poznámka: 1. Na riedenie sér použite nulové kalibračné činidlo.

2. 1 pg kalibračného činidla zodpovedá 1 pg NIBSC 74/555

#### VI. NEDODANÝ SPOTREBNÝ MATERIÁL

Vyžaduje sa nasledujúci materiál, ktorý však nie je súčasťou súpravy:

- Destilovaná voda
- Pipety na dávkovanie: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml a 3 ml. (odporúča sa používanie presných pipiet s jednorazovými plastovými špičkami)
- Vortexový mixér
- Magnetické miešadlo
- Trepačka skúmaviek (400 ot./min.)
- 5 ml automatická striekačka (typ Cornwall) na premývanie

- Aspiračný systém (voliteľný)
- Môže sa použiť akékoľvek gama počítadlo schopné merať <sup>125</sup>I (minimálny efektívnosť 70 %).

#### VII. PRÍPRAVA ČINIDLÁ

- Kalibračné činidlá:** Nulové kalibračné činidlo zmiešajte s 5 ml rekonštitučného roztoku a ďalšie kalibračné činidlá zmiešajte s 1 ml rekonštitučného roztoku.
- Kontrolné vzorky:** Kontrolné vzorky zmiešajte s 1 ml rekonštitučného roztoku.
- Roztok na sledovanie izotopov:** Pripravte primeraný objem roztoku na sledovanie izotopov pridaním 50 µl roztoku Anti-ACTH-<sup>125</sup>I do 1 ml pufru na sledovanie izotopov. Dôkladne premiešajte pomocou vortexového mixéru.
- Pracovný premývací roztok:** Pripravte primeraný objem pracovného premývacieho roztoku pridaním 19 dielikov destilovanej vody do 1 dielika premývacieho roztoku (20x). Dôkladne premiešajte pomocou magnetického miešadla. Nepoužitý pracovný premývací roztok zlikvidujte na konci dňa.

#### VIII. SKLADOVANIE A DÁTUM EXSPIRÁCIE ČINIDIEL

- Pred otvorením alebo rozriedením sú všetky súčasti súpravy stabilné až do dátumu expirácie, ktorý je uvedený na štítku, ak sa uchovávajú pri teplote 2 až 8 °C.
- Kalibračné činidlá a kontrolné vzorky sú veľmi nestabilné, okamžite ich použite po príprave, okamžite zmrazte v alikvotoch a uchovávajte ich pri teplote -20 °C maximálne 7 týždňov. Vyhnite sa následným cyklom mrazovania a rozmrazovania.
- Čerstvo pripravený pracovný premývací roztok spotrebujte v daný deň.
- Po prvom použití je roztok na sledovanie izotopov stabilný až do dátumu expirácie, ak sa uchováva v pôvodnej dobre uzavretej liekovke pri teplote -20 °C.
- Zmeny vo fyzickom vzhľade činidiel súpravy môžu naznačovať nestabilitu alebo zhoršenie kvality.

#### IX. ODBER A PRÍPRAVA VZORIEK

- Mal by sa používať plazma EDTA a mali by sa dodržiavať zvyčajné opatrenia pri venepunkcii.
- Vzorky by sa mali odobrať a umiestniť na ľad okamžite alebo odobrať do vopred vychladených skúmaviek. Okamžite odstredte v chladenej centrifúge (2 – 8 °C). Ak sa neotestujú okamžite (do jednej hodiny), suprenatant plazmy odstráňte do vhodne označenej plastovej skladovacej nádoby a zmrazte pri teplote -70 °C alebo nižšej (max. 45 dní).
- Vzorky nemusia zostať stabilné, keď sa skladujú pri teplote -20 °C.
- Nepoužívajte hemolyzované alebo lipemické vzorky.

#### X. POSTUP

##### A. Poznámky k manipulácii

Súpravu ani jej súčasti nepoužívajte po dátume expirácie. Nemiešajte materiály z rôznych súprav. Pred použitím všetky činidlá ohrejte na izbovú teplotu. Všetky činidlá a vzorky dôkladne premiešajte jemným miešaním alebo vírením. Pri pridávaní každého činidla a vzorky používajte čistý jednorazový hrot pipety, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii. Vysoko presné pipety alebo automatizované pipetovacie zariadenia zlepšia presnosť. Dodržiavajte inkubačné časy. Pripravte kalibračnú krivku pre každý cyklus, nepoužívajte údaje z predchádzajúcich cyklov.

##### B. Postup

- Skúmavky s povrchovou úpravou označte v dvoch vyhotoveniach pre každé kalibračné činidlo, kontrolnú vzorku aj vzorku. Na stanovenie celkového počtu označte 2 normálne skúmavky.
- Krátko vo vortexovom mixéri premiešajte kalibračné činidlá, kontrolné vzorky a vzorky a do príslušných skúmaviek vložte po 200 µl z každého z týchto látok.
- Do každej skúmavky nadávkujte 50 µl inkubačného pufru okrem skúmaviek na stanovenie celkového počtu.
- Jemne rukou pretrepte stojan obsahujúci skúmavky, aby ste uvoľnili zachytené vzduchové bubliny.
- Inkubujte 2 hodiny pri izbovej teplote v trepačke skúmaviek (400 ot./min.).
- Odsajte obsah každej skúmavky (okrem skúmavky na stanovenie celkového počtu). Dbajte na to, aby plastový hrot odsávačky dosiahol na spodnú časť skúmavky s povrchovou úpravou, aby sa odstránila všetka kvapalina.

- Skúmavky premyte 2 ml premývacieho roztoku (okrem skúmavky na stanovenie celkového počtu). Počas pridávania pracovného premývacieho roztoku sa vyhnite peneniu
- Odsajte obsah každej skúmavky (okrem skúmavky na stanovenie celkového počtu).
- Skúmavky znova premyte 2 ml premývacieho roztoku (okrem skúmavky na stanovenie celkového počtu) a odsajte.
- Po poslednom premytí nechajte skúmavky stáť dva minúty vzpriamene a odsajte zvyšnú kvapku kvapaliny.
- Do každej skúmavky vrátane skúmaviek bez povrchovej úpravy a skúmaviek na stanovenie celkového počtu nadávkuje 100 µl látky na sledovanie izotopu anti- $^{125}\text{I}$ .
- Jemne rukou pretrepte stojan obsahujúci skúmavky, aby ste uvoľnili zachytené vzduchové bubliny.
- Inkubujte 1 hodinu pri izbovej teplote v trepačke skúmaviek (400 ot./min.).
- Odsajte obsah každej skúmavky (okrem skúmavky na stanovenie celkového počtu). Dbajte na to, aby plastový hrot odsávačky dosiahol na spodnú časť skúmavky s povrchovou úpravou, aby sa odstránila všetka kvapalina.
- Skúmavky premyte 2 ml premývacieho roztoku (okrem skúmavky na stanovenie celkového počtu). Počas pridávania pracovného premývacieho roztoku sa vyhnite peneniu
- Odsajte obsah každej skúmavky (okrem skúmavky na stanovenie celkového počtu).
- Skúmavky znova premyte 2 ml premývacieho roztoku (okrem skúmavky na stanovenie celkového počtu) a odsajte.
- Po poslednom premytí nechajte skúmavky stáť dva minúty vzpriamene a odsajte zvyšnú kvapku kvapaliny.
- Skúmavky odčítajte v počítadle gama po dobu 60 sekúnd.

## XI. VÝPOČET VÝSLEDKOV

- Vypočítajte priemer duplikátnych hodnôt.
- Nakreslite graf cpm (os Y) pre každé kalibračné činidlo v porovnaní so zodpovedajúcou koncentráciou ACTH (os X) a nakreslite kalibračnú krivku cez kalibračné body, odmietnite zrejme odľahlé hodnoty.
- Zistite koncentráciu pre každú kontrolnú vzorku a vzorku interpoláciou na kalibračnej krivke.
- Počítačom podporované zmenšenie počtu údajov zjednoduší tieto výpočty. Ak sa používa automatické spracovanie výsledkov, odporúča sa aproximácia krivky 4-parametrovej logistickej funkcie.

## XII. TYPICKÉ ÚDAJE

Nasledujúce údaje slúžia len na ilustráciu a nikdy by sa nemali používať namiesto kalibračnej krivky v reálnom čase.

ACTH-IRMA		cpm	B/T (%)
Celkový počet		273476	100
Kalibračné činidlo	0,0 pg/ml	418	0,2
	9,6 pg/ml	1580	0,6
	31,2 pg/ml	3836	1,4
	97,2 pg/ml	10839	4,0
	295,4 pg/ml	27691	10,1
	1006,4 pg/ml	64156	23,5
	1931,9 pg/ml	93486	34,2

## XIII. EFEKTIVITA

### A. Detekčný limit

Dvadsať nulových kalibračných činidiel sa testovalo spolu so sériou iných kalibračných činidiel. Detekčný limit, definovaný ako tri štandardné odchýlky zdanlivej koncentrácie vyššie ako priemerná počty pri nulovej viazanosti, bol 1,16 pg/ml.

### B. Špecifickosť

Možné interferujúce peptidy sa pridali do EDTA plazmy s nízkou aj k vysokou hladinou ACTH. Namerala sa zdanlivá reakcia ACTH.

Analyt pridaný k plazme EDTA s nízkou hladinou ACTH	Pozorovaná hladina ACTH (pg/ml)	Analyt pridaný k plazme EDTA so strednou hladinou ACTH	Pozorovaná hladina ACTH (pg/ml)

Nič	0,9	Nič	34,5
ACTH 1 – 17 fragment	0,8	ACTH 1 – 17 fragment	25,0
100 000 pg/ml	7,1	100 000 pg/ml	33,5
ACTH 18 – 39 fragment	364,7	ACTH 18 – 39 fragment	450,0
100 000 pg/ml	1,8	100 000 pg/ml	31,6
Potkani ACTH 1000 pg/ml	0,9	Potkani ACTH 1000 pg/ml	33,0
αMSH 100 000 pg/ml	1,1	αMSH 100 000 pg/ml	32,8
βMSH 100 000 pg/ml		βMSH 100 000 pg/ml	
βEndorfin 100 000 pg/ml		βEndorfin 100 000 pg/ml	

Tento test dokazuje, že ACTH-IRMA nereaguje s fragmentmi ACTH, αMSH, βMSH a βendorfinom, ale krížovo reaguje s potkaním ACTH na úrovni 39 %

## C. Presnosť

V RÁMCI VZORKY				MEDZI VZORKAMI			
Sérum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	19	17,5 ± 1,1	6,4	D	15	29,6 ± 1,4	4,8
B	20	69,3 ± 2,1	3,0	E	15	121,9 ± 7,5	6,2
C	20	386,7 ± 15,1	3,9				

SD: Štandardná odchýlka; CV: Varičný koeficient

## D. Presnosť

TEST OBNOVY			
Vzorka	Pridané ACTH (pg/ml)	Obnovené ACTH (pg/ml)	Obnova (%)
1	1100,0	1128,0	102,5
	550,0	552,5	100,5
	275,0	273,8	99,6
	137,5	149,0	108,4

TEST RIEDENIA			
Vzorka	Riedenie	Teoretický koncent. (pg/ml)	Nameraná koncent. (pg/ml)
1	1/1	–	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
2	1/64	7,8	7,4
	1/1	–	348,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,6	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Vzorky sa zriedili nulovým kalibračným činidlom.

## E. Časové oneskorenie

Ako sa uvádza nižšie, výsledky testu zostávajú presné aj vtedy, keď sa vzorka dávkuje 30 minút po pridaní kalibračného činidla do skúmaviek s povrchovou úpravou.

	0'	10'	20'	30'
C1	546,1	563,9	563,4	568,9
C2	86,6	88,7	89,0	85,9
C3	44,4	44,4	42,9	43,2
C4	122,4	123,0	122,6	121,0

## F. Hákový efekt

Vzorka EDTA plazmy s koncentráciou ACTH 69 000 pg/ml poskytuje signál vyšší ako je najvyššia koncentrácia kalibračného činidla.

## XIV. OBMEDZENIA

- Vzorky pacientov, ktorí dostali prípravky myších monoklonálnych protilátok na diagnostiku alebo liečbu, môžu obsahovať ľudské protilátky proti myším protilátkam (HAMA). Takéto vzorky môžu vykazovať buď falošne zvýšené, alebo znížené hodnoty, keď sa testujú s testovacími súpravami, ktoré používajú myšie monoklonálne protilátky.
- Heterofilné protilátky v ľudskom sére môžu reagovať s reagenčnými imunoglobulínmi spôsobujúcimi interferencie *in vitro* imunotestami. Pacienti bežne vystavení zvieratám alebo živočíšnym sérovým produktom môžu byť náchylní na túto interferenciu a v prípade prítomnosti heterofilných protilátok sa môžu pozorovať anomálne hodnoty. Starostlivo vyhodnocujte výsledky pacientov, u ktorých existuje podozrenie, že majú tieto protilátky. Ak výsledky nie sú v súlade s inými klinickými pozorovaniami, pred diagnózou by sa mali vyžadovať ďalšie informácie.

## XV. INTERNÁ KONTROLA KVALITY

- Ak výsledky získané pre kontrolnú vzorku 1 a/alebo kontrolnú vzorku 2 nie sú v rozsahu uvedenom na štítku liekovky, výsledky sa nemôžu použiť, pokiaľ nebolo poskytnuté uspokojivé vysvetlenie nezrovnalosti.
- Ak je to žiaduce, každé laboratórium môže vytvoriť vlastné databázy kontrolných vzoriek, ktoré by sa mali zmrziť v alikvotoch.
- Akceptačné kritériá pre rozdiel medzi duplicitnými výsledkami vzoriek by sa mali spoliehať na osvedčené laboratórne postupy.

## XVI. REFERENČNÉ INTERVALY

Nižšie uvedené hodnoty sú uvedené len ako usmernenia; každé laboratórium by malo stanoviť svoj vlastný normálny rozsah hodnôt. Rozsah hladín ACTH u 47 normálnych pacientov, vyjadrený ako 5 % až 95 % percentily, bol 9,6 až 49,7 pg/ml.

## XVII. BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA A VÝSTRAHY

### Bezpečnosť

Len na diagnostické použitie *in vitro*.

Táto súprava obsahuje <sup>125</sup>I (polčas: 60 dní), ktorý vyžaruje ionizujúce žiarenie X (28 keV) a  $\gamma$  (35,5 keV).

Tento rádioaktívny výrobok môžu prenášať a používať len oprávnené osoby; nákup, skladovanie, používanie a výmena rádioaktívnych výrobkov podlieha právnym predpisom krajiny koncového používateľa. V žiadnom prípade sa daný výrobok nesmie podávať ľuďom alebo zvieratám.

So všetkými rádioaktívnymi látkami by sa malo manipulovať vo vyhradenom priestore mimo bežného priestoru. V laboratóriu sa musí viesť denník o prijíme a skladovaní rádioaktívnych materiálov. Laboratórne vybavenie a sklo, ktoré by mohlo byť kontaminované rádioaktívnymi látkami, by sa mali oddeliť, aby sa zabránilo krížovej kontaminácii rôznych rádioizotopov.

Všetky rozliate rádioaktívne tekutiny sa musia okamžite odstrániť v súlade s postupmi radiačnej bezpečnosti. Rádioaktívny odpad sa musí likvidovať v súlade s miestnymi predpismi a usmerneniami orgánov, ktoré sú nadriadeným orgánom daného laboratória. Dodržiavanie základných pravidiel radiačnej bezpečnosti poskytuje primeranú ochranu.

Zložky ľudskej krvi zahrnuté v tejto súprave boli testované európskymi a/alebo FDA schválenými metódami a zistili sa negatívne výsledky v súvislosti s HBsAg, protilátkami HCV, protilátkami HIV-1 a 2. Žiadna známa metóda nemôže poskytnúť úplnú istotu, že deriváty ľudskej krvi nebudú prenášať hepatitídu, AIDS ani iné infekcie. V dôsledku toho by manipulácia s činidlami, vzorkami séra alebo plazmy mala byť v súlade s miestnymi bezpečnostnými postupmi.

Všetky živočíšne produkty a deriváty boli odoberaté zo zdravých zvierat. Hovädzie zložky pochádzajú z krajín, v ktorých nebola hlásená BSE. Zložky obsahujúce živočíšne látky by sa však mali považovať za potenciálne infekčné.

Zabráňte kontaktu pokožky s činidlami (azid sodný ako konzervačná látka). Azid v tejto súprave môže reagovať s olovom a meďou v potrubí, v dôsledku čoho môže vytvoriť vysoko výbušné kovové azidy. Počas premývacieho kroku opláchnite odtok veľkým množstvom vody, aby sa zabránilo hromadeniu azidu. V pracovnom priestore nefajčite, nepite, nejedzte ani nepoužívajte kozmetiku. Nepipetujte ústami. Používajte ochranný odev a jednorazové rukavice.

## XVIII. LITERATÚRA

1. SMITH IA, FUNDER JW. **Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.**

Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.

2. LUMPKIN MD. **The regulation of ACTH secretion by IL-1.** Science 1987; 238:452-454.
3. MILLER WL. **Molecular biology of steroid hormones synthesis.** Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.
4. FRASER NL. **Storage of biological sample.** NASA Cr- 1967; 781.
5. RAFF H. **Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.
6. GOVERDE HJ. **Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson's syndrome.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.
7. GOVERDE HJ. **The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.** Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.
8. LAMBERT A. **On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.** Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.
9. KRIEGER DT. **Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.
10. KRIEGER DT. **Physiopathology of Cushing's disease.** Endocrine Review. 1983; 4:22-43.
11. GANONG WF. **ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.** N Engl J Med. 1974; 290-1006.
12. PRIMUS FJ, KELLEY EA, HANSEN HJ, GOLDENBERG DM. **Sandwich – Type Immunoassay of Carcinoembryonic Antigen in Patients Receiving Murine Monoclonal Antibodies for Diagnosis and Therapy.** Clin Chem 1988;34:261
13. SCHROFF RW, FOON KA, BEATTY SM, OLDHAM RK, MORGAN AC JR. **Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy.** Cancer Res 1985;45:879-85
14. BOSCATO LM, STUART MC. **Heterophilic Antibodies: A problem for All Immunoassays** Clin Chem 1988; 34(1):27-33

**XIX. ZHRNUTIE PROTOKOLU**

	<b>CELKOVÝ POČET μl</b>	<b>KALIBRAČNÉ ČINIDLÁ μl</b>	<b>KONTROLNÉ VZORKY μl</b>
Kalibračné činidlá (0 až 6)	-	200	-
Kontroly, kontrolné vzorky	-	50	200
Inkubačný pufer			50
Inkubácia	2 hodiny pri izbovej teplote s trepačkou skúmaviek nastavenou na 400 ot./min		
Separácia	-		odsat'
Premývací roztok	-		2,0
Separácia	-		odsat'
Premývací roztok	-		2,0
Separácia	-		odsat'
Látka na sledovanie izotopov	100	100	100
Inkubácia	1 hodinu pri izbovej teplote s trepačkou skúmaviek nastavenou na 400 ot./min		
Separácia	-		odsat'
Premývací roztok	-		2,0
Separácia	-		odsat'
Premývací roztok	-		2,0
Separácia	-		odsat'
Počítanie	Počítajte skúmaviek po dobu 60 sekúnd		

Ďalšie preklady tohto návodu na použitie si môžete stiahnuť z našej webovej lokality: <https://www.diasource-diagnostics.com/>