

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

ACTH ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of adenocorticotrophic hormone (ACTH) in EDTA Plasma



REF DE3647

 96

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

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

1	INTENDED USE	3
2	SUMMARY AND EXPLANATION.....	3
3	CLINICAL SIGNIFICANCE	4
4	PRINCIPLE OF THE TEST	4
5	KIT COMPONENTS.....	5
6	WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS	5
7	SAMPLE COLLECTION AND STORAGE	5
8	REAGENT PREPARATION AND STORAGE	6
9	ASSAY PROCEDURE.....	6
10	CALCULATION OF RESULTS	7
11	QUALITY CONTROL.....	8
12	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	8
13	EXPECTED VALUES	8
14	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	9
1	VERWENDUNGSZWECK	11
2	ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG	11
3	KLINISCHE BEDEUTUNG	11
4	TESTPRINZIP	12
5	TESTKIT-KOMPONENTEN.....	13
6	WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN	13
7	PROBENENTNAHME UND LAGERUNG	13
8	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG.....	14
9	TESTVERFAHREN.....	14
10	VERFAHRENSTECHNISCHE HINWEISE.....	15
11	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	15
12	QUALITÄTSKONTROLLE	17
13	GRENZEN DES VERFAHRENS	17
14	ERWARTETE WERTE	17
15	LEISTUNGSMERKMALE	17
16	REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA	18
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	20

1 INTENDED USE

The DEMEDITEC ACTH ELISA is intended for the quantitative determination of ACTH (Adrenocorticotrophic Hormone) in human plasma. This assay is intended for *in vitro* diagnostic use.

2 SUMMARY AND EXPLANATION

ACTH (Adrenocorticotrophic hormone) or corticotropin is a 39-amino acid peptide hormone (MW=4500) secreted by the pituitary to regulate the production of steroid hormones by the adrenal cortex. ACTH secretion from the anterior pituitary is controlled by both a classical negative feedback control mechanism and CNS-stress mediated control system.¹

Various types of stress or pain perceived in higher levels of the brain modulate secretion of the hypothalamic neurosecretory hormone, corticotropin releasing hormone (CRH), a 41-amino acid peptide. CRH stimulates pituitary ACTH secretion. The second peptide that modulates ACTH secretion is vasopressin (AVP). AVP secretion is also stimulated by stress and acts synergistically with CRH to increase ACTH secretion in the pituitary portal circulation. ACTH increases the synthesis and release of all adrenal steroids, aldosterone, cortisol and adrenal androgens. It is the principal modulator of cortisol, the most important glucocorticoid in man. As the cortisol level in blood increases, release of ACTH is inhibited directly at the pituitary level. Through this same mechanism, decreasing cortisol levels lead to elevated ACTH levels.^{2,3,4,5}

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

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

3 CLINICAL SIGNIFICANCE

Plasma ACTH assays are useful in the differential diagnosis of pituitary Cushing's disease, Addison's disease, autonomous ACTH producing pituitary tumors (e.g. Nelson's syndrome), hypopituitarism with ACTH deficiency and ectopic ACTH syndrome.^{5,6,7,8,9,10} Cushing's syndrome is caused by the effects of excess glucocorticoid actions. All causes of Cushing's syndrome, with the exception of glucocorticoid medication, are associated with increased 24-hour urinary cortisol. The most common cause of Cushing's syndrome is bilateral adrenal hyperplasia, due to pituitary ACTH hypersecretion (Cushing's disease) from a pituitary adenoma or corticotroph hyperplasia.^{5,6,7,8,9,10} Laboratory diagnosis of Cushing's disease is supported by the following: (1) suppression of plasma ACTH and cortisol concentrations, by high-dose (2.0 mg q 6h x 8) dexamethasone administration, (2) absence of ACTH and cortisol suppression with low-dose (0.5 mg q 6h x 8 or 1 mg given at 23:30 hour) dexamethasone, (3) larger than normal response to metyrapone (Metopirone) stimulation and normal or elevated plasma ACTH levels.⁴ When Cushing's syndrome is caused by primary adrenal abnormality (adenoma or carcinoma), the adrenal gland acts independently of ACTH and pituitary ACTH secretion is suppressed.^{5,6,7,8,9,10} Hence, there is no response to dexamethasone suppression or metyrapone stimulation. This type of Cushing's syndrome is characterized by very low, or undetectable levels of ACTH. Therefore, measurement of plasma ACTH is helpful in differential diagnosis of pituitary Cushing's syndrome. In patients with adrenal tumors, ACTH levels are low. High levels of ACTH are seen in patients with ectopic ACTH syndrome. Patients with bilateral adrenal hyperplasia will have ACTH levels inappropriately elevated for their degree of hypercortisolism, which should suppress ACTH. However, in most cases the ACTH concentration will be within the normal range. Adrenocortical insufficiency or inadequate cortisol production can be due to destruction of the adrenal cortex or to abnormalities of the pituitary or hypothalamus, which result in inadequate ACTH production or release.^{5,6,7,8,9,10} Primary adrenocortical insufficiency, Addison's disease, is characterized by markedly elevated plasma ACTH levels and adrenal unresponsiveness to stimulation with exogenous ACTH. Hypopituitarism with ACTH deficiency, which is secondary adrenocortical insufficiency, is characterized by low plasma ACTH and cortisol concentrations, and a subnormal, but usually distinct adrenal response to stimulation with synthetic ACTH (Cortrosyn[®]). If hypoglycemic stress or metyrapone stimulation is required for diagnosis, ACTH and cortisol responses are less than normal. Aggressive and invasive ACTH producing pituitary tumors occurring before or following bilateral adrenalectomy for Cushing's disease (Nelson's syndrome) are characterized by the development of Addisonian pigmentation, often in an adrenalectomized patient who is taking adequate glucocorticoid replacement therapy. In these patients, plasma ACTH levels are markedly elevated and do not respond well to dexamethasone suppression.

4 PRINCIPLE OF THE TEST

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

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

In this assay, calibrators, controls, or patient samples are simultaneously incubated with the enzyme labeled antibody and a biotin coupled antibody in a streptavidin-coated microplate well. At the end of the assay incubation, the microwell is washed to remove unbound components and the enzyme bound to the solid phase is incubated with the substrate, tetramethylbenzidine (TMB). An acidic stopping solution is then added to stop the reaction and converts the color to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of ACTH in the sample. A dose response curve of absorbance unit vs. concentration is generated using results obtained from the calibrators. Concentrations of ACTH present in the controls and patient samples are determined directly from this curve.

5 KIT COMPONENTS

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

5.1 MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader.
- Microplate washer [if washer is unavailable, manual washing may be acceptable].
- Precision Pipettors to deliver 25, 200, 100 and 150 µL.
- (Optional): A multi-channel dispenser or a repeating dispenser for 25, 100 and 150 µL.

6 WARNINGS AND PRECAUTIONS FOR USERS

Although the reagents provided in this kit has been specifically designed to contain no human blood components, the human patient samples, which might be positive for HBsAg, HbCag or HIV antibodies, must be treated as potentially infectious biohazard. Common precautions in handling should be exercised, as applied to any untested patient sample. Stopping Solution, consists of 1 N acidic solution. This is a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves and eye protection, with appropriate protective clothing. Any spill should be wiped immediately with copious quantities of water. Do not breathe vapor and avoid inhalation.

7 SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The determination of ACTH should be performed on EDTA plasma. To assay the specimen in duplicate, 400 µL of EDTA plasma is required. Collect whole blood in a lavender [EDTA] tube. The plasma should be promptly separated, preferably in a refrigerated centrifuge, and stored at -20 °C or lower. EDTA plasma samples may be stored up to 8 hours at 2 - 8 °C. EDTA plasma samples frozen at -20 °C are stable for up to 4 months.

8 REAGENT PREPARATION AND STORAGE

Store all kit components at 2 - 8 °C

1. All reagents except the non-zero calibrators, kit controls and the Wash Concentrate are ready-to-use. Store all reagents at 2 - 8 °C, except the Wash Concentrate, which should be kept at room temperature until dilution to avoid precipitation.
2. For each of the non-zero calibrators (Calibrator B through F) and kit controls 1 and 2, reconstitute each vial with 2 mL of distilled or deionized water and mix. Allow the vial to stand for 10 minutes and then mix thoroughly by gentle inversion to insure complete reconstitution. **Use the calibrators and controls as soon as possible upon reconstitution. Freeze (-20 °C) the remaining calibrators and controls as soon as possible after use.** Standards and controls are stable at -20 °C for 6 weeks after reconstitution with up to 3 freeze thaw cycles when handled as recommended in "Procedural Notes" section.
3. **ELISA Reagent A:** Wash Concentrate: Mix contents of wash concentrate thoroughly. If precipitate is present in the Wash Concentrate due to storage at lower temperature such as 4 °C, dissolve by placing the vial in a 37 °C water bath or oven with swirling or stirring. Add wash concentrate (30 mL) to 570 mL of distilled or deionized water and mix. The diluted working wash solution is stable for 90 days when stored at room temperature.

9 ASSAY PROCEDURE

1. Place sufficient **Streptavidin Coated Strips** in a holder to run all six (6) calibrators, A - F of the ACTH CALIBRATORS [Exact concentration is stated on the QC data sheet], Controls and patient samples. At a minimum, designate two wells to serve as "blanks". Refer to Step 9 for final plate reading.
2. Pipet **200 µL** of calibrators, controls, and samples into the designated or mapped well. **Freeze (-20 °C) the remaining calibrators and controls as soon as possible after use.**
3. Add or dispense **25 µL** of Reagent 1 (Biotinylated Antibody) into each of the wells which already contain the calibrators, controls, and samples.
4. Add or dispense **25 µL** of Reagent 2 (Enzyme Labeled Antibody) into each of the same wells. Cover the microplate(s) with aluminum foil or a tray to avoid exposure to light, and place it on an **orbital shaker or rotator** set at 170 ± 10 rpm for **4 hours** \pm 30 minutes at room temperature (22 °C - 28 °C).
5. First aspirate the fluid completely and then wash/aspirate each well five (5) times with the Working Wash Solution (prepared from **ELISA Reagent A**), using an automatic microplate washer. Blot dry by inverting the plate on an absorbent material. The wash solution volume should be set to dispense 0.35 mL into each well.
6. Add or dispense **150 µL** of the **ELISA Reagent B** (TMB Substrate) into each of the wells.
7. With appropriate cover to avoid light exposure, place the microplate(s) on an **orbital shaker or rotator** set at 170 ± 10 rpm for **30 \pm 5 minutes** at room temperature (22 °C - 28 °C).
8. Add or dispense **100 µL** of the Stopping Solution into each of the wells. Mix gently.
9. Read the absorbance of the solution in the wells within 10 minutes, using a microplate reader set to **450 nm**. Prior to reading, ensure both "blank wells" as mentioned in Step 1 are filled with 250 µL of distilled or deionized water. **Read the plate again** with the reader set to **405 nm** against distilled or deionized water
Note: The second reading is designed to extend the analytical validity of the calibration curve to the value represented by the highest calibrator, which is approximately 500 pg/mL. Hence, patient samples with ACTH > 150 pg/mL can be quantified against a calibration curve consisting of the readings all the way up to the concentration equivalent to the highest calibrator using the 405 nm reading, away from the wavelength of maximum absorbance. In general, patient and control samples should be read using the 450 nm for ACTH concentrations up to 150 pg/mL. ACTH concentrations above 150 pg/mL should be interpolated using the 405 nm reading.
10. By using the final absorbance values obtained in the previous step, construct a calibration curve via cubic spline, 4 parameter logistics, or point-to-point interpolation to quantify the concentration of the ACTH.

9.1 PROCEDURAL NOTES

- ACTH 1-39 is a very labile molecule. Set up the assay immediately upon the reconstitution or the thawing of all calibrators, controls, and patient samples.
- It is recommended that all calibrators, controls, and patient samples are assayed in duplicate. The average absorbance units of duplicate sets should then be used for reduction of data and the calculation of results.
- The samples should be pipetted into the well with minimum amount of air-bubble. To achieve this, "reverse pipet" described in the package insert of the manufacturers of Pipettors is recommended.
- Patient samples with values greater than the highest calibrator (Calibrator F), which is approximately 500 pg/mL (see exact concentration on QC data sheet), may be diluted with Calibrator A (Zero Calibrator) and reassayed. Multiply the result by the dilution factor.
- Reagents from different lot numbers must not be interchanged.
- If preferred, mix in equal volumes, in sufficient quantities for the assay, Reagent 1 (Biotinylated Antibody) and Reagent 2 (Enzyme Labeled Antibody) in a clean amber bottle, Then use 50 µL of the mixed antibody into each well. This alternative method should replace Step (3) and (4), to be followed with the incubation with orbital shaker.
- When mixing avoid splashing of reagents from wells. This will affect assay precision and accuracy

10 CALCULATION OF RESULTS

10.1 Manual Method

1. For the 450 nm readings, construct a dose response curve (calibration curve) using the first five calibrators provided, i.e. Calibrators A, B, C, D and E. For the 405 nm readings, construct a second dose response curve using the three calibrators with the highest concentrations, i.e. Calibrators D, E and F.
2. Assign the concentration for each calibrator stated on the vial in pg/mL. Plot the data from the calibration curve on linear graph paper with the concentration on the X-axis and the corresponding A.U. on the Y-axis.
3. Draw a straight line between 2 adjacent points. This mathematical algorithm is commonly known as the "point-to-point" calculation. Obtain the concentration of the sample by locating the absorbance unit on the Y-axis and finding the corresponding concentration value on the X-axis. Patient and control samples should be read using the 450 nm for ACTH concentrations up to 150 pg/mL. ACTH concentrations above 150 pg/mL should be interpolated using the 405 nm reading.

10.2 Automated Method

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

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

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

* Because the concentration readout is > 150 pg/mL, it is recommended to use the data obtained at 405 nm as shown in **Sample Data at 405 nm** in the table below.

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

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

¶ For samples with readout < 150 pg/mL, it is recommended to use the data obtained at 450 nm as shown in **Sample Data at 450 nm** in the table above. This practice should give the results with optimum sensitivity of the assay.

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

11 QUALITY CONTROL

Control plasma or plasma pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results generated from the analysis of the control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

12 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The ACTH ELISA kit has exhibited no "high dose hook effect" with samples spiked with 20,000 pg/mL of ACTH. Samples with ACTH levels greater than the highest calibrator, however, should be diluted and reassayed for correct values. Like any analyte used as a diagnostic adjunct, ACTH results must be interpreted carefully with the overall clinical presentations and other supportive diagnostic tests.

13 EXPECTED VALUES

ACTH levels were measured in one hundred and thirty four (134) apparently normal individuals in the U.S. with the ACTH ELISA. The values obtained ranged from 7.0 to 63 pg/mL. Based on statistical tests on skewness and kurtosis, the population, when transformed logarithmically, follows the normal or Gaussian distribution. The geometric mean \pm 2 standard deviations of the mean were calculated to be 6.17 to 58.2 pg/mL.

14 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 Accuracy

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

$$\text{ACTH ELISA (DE3647)} = 1.02 - 1.58 \text{ pg/mL}$$

$$r = 0.995 \quad N = 300$$

14.2 Sensitivity

The sensitivity, or minimum detection limit, of this assay is defined as the smallest single value, which can be distinguished from zero at the 95% confidence limit. The ACTH ELISA (DE3647) has a calculated sensitivity of 0.22 pg/mL.

14.3 Precision and Reproducibility

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

Intra-Assay Variation

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

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

Inter-Assay Variation

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

14.4 Specificity and Cross-Reactivity

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

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

14.5 Recovery

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

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

14.6 Kinetic Effect of the Assay

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

14.7 Linearity of Patient Sample Dilutions: Parallelism

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

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

1 VERWENDUNGSZWECK

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

2 ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

ACTH (adrenocorticotropes Hormon) oder Corticotropin ist ein Peptidhormon (MG=4500) aus 39 Aminosäuren, das von der Hypophyse zur Regulierung der Steroidhormonproduktion in der Nebennierenrinde abgegeben wird. Die ACTH-Sekretion durch den Hypophysenvorderlappen wird sowohl mittels eines klassischen negativen Rückkopplungsmechanismus als auch von einem Kontrollsystem, das ZNS-Reize übermittelt, gesteuert.¹ Unterschiedliche, in übergeordneten Ebenen des Gehirns wahrgenommene Formen von Stress oder Schmerzen beeinflussen die Sekretion des hypothalamischen neurosekretorischen Hormons CRH (Corticotropin Releasing Hormon), einem Peptid aus 41 Aminosäuren. CRH stimuliert die Ausschüttung von ACTH in der Hypophyse. Das zweite Peptid, das die ACTH-Sekretion beeinflusst, ist Vasopressin (ADH). Die ADH-Sekretion wird ebenfalls durch Reize angeregt. ADH und CRH bewirken synergistisch eine gesteigerte ACTH-Ausschüttung im Pfortaderkreislauf der Hypophyse. ACTH steigert die Bildung und Freisetzung aller in der Nebennierenrinde gebildeten Steroidhormone, wie Aldosteron, Kortisol und Androgene. ACTH ist der wesentlichste Modulator von Kortisol, dem für den Menschen wichtigsten Glucocorticoid. Wenn der Kortisolspiegel im Blut steigt, wird die ACTH-Ausschüttung direkt auf Hypophysenebene gehemmt. Über denselben Mechanismus führen sinkende Kortisolspiegel zu erhöhten ACTH-Spiegeln.^{2,3,4,5} Biologisch aktives ACTH ist das Ergebnis einer enzymatischen Spaltung von Proopiomelanocortin (POMC), eines großen Vorläufermoleküls. Dieses Molekül beinhaltet in seiner Struktur die Aminosäuresequenzen von ACTH, Pro-ACTH, β -Melanozyten-stimulierendem Hormon, Lipoprotein sowie Endorphin und den Enkephalinen. Da die Reaktion in Immunoassays durch die antigene Struktur und nicht durch die biologische Funktion bestimmt wird, kommt es im üblichen ACTH RIA zu Reaktionen mit POMC, Pro-ACTH, ACTH und einigen ACTH-Fragmenten.⁵ Wie andere Hypophysenhormone wird ACTH pulsweise freigegeben. Diese minimalen Ausschüttungen werden von einem charakteristischen zirkadianen Rhythmus überlagert. Bei gesunden Personen erreicht die ACTH-Konzentration früh am Morgen (6:00 – 8:00 Uhr) einen Höhepunkt, während die Konzentrationen spät am Abend und kurz vor dem Einschlafen am niedrigsten sind. Auf Grund dieses Tagesrhythmus werden Plasma-ACTH-Proben üblicherweise zwischen 8:00 und 10:00 Uhr entnommen. Eine Abgrenzung gesunder Personen gegen Patienten mit Cushing-Syndrom ist jedoch am ehesten gewährleistet, wenn die Proben abends (16:00 – 18:00 Uhr) entnommen werden. Beim Vorliegen des Cushing-Syndroms und bei ektopischen ACTH-Syndromen ist die an den Tagesrhythmus gebundene ACTH-Sekretion für gewöhnlich aufgehoben. Auch durch Stress kann es zu einer Störung dieses Rhythmus kommen.

3 KLINISCHE BEDEUTUNG

Plasma-ACTH-Tests eignen sich für die Differentialdiagnose von hypophysär bedingtem Cushing-Syndrom, Addison-Krankheit, durch autonomes ACTH verursachten Hypophysentumoren (z.B. Nelson-Tumor), Hypophysenunterfunktion mit ACTH-Mangel und ektopischem ACTH-Syndrom.^{5,6,7,8,9,10} Das Cushing-Syndrom wird durch ein Überangebot von Glucocorticoiden verursacht. Alle Ursachen des Cushing-Syndroms, mit Ausnahme der therapeutischen Verabreichung von Glucocorticoiden, gehen mit erhöhten 24 h-Harn-Kortisolwerten einher. Die häufigste Ursache des Cushing-Syndroms ist die bilaterale Nebennierenhyperplasie, verursacht durch eine hypophysäre ACTH-Hypersekretion (Morbus Cushing) eines Hypophysen-Adenoms oder einer corticotrophen Hyperplasie.^{5,6,7,8,9,10} Eine labortechnische Diagnose des Cushing-Syndroms wird durch folgende Beobachtungen bestätigt: (1) Suppression der Konzentrationen von Plasma-ACTH und Kortisol bei hochdosierter Gabe von Dexamethason (2,0 mg alle 6 Stunden über 8 Tage), (2) fehlende Suppression von ACTH und Kortisol bei geringdosierter Gabe von Dexamethason (0,5 mg alle 6 Stunden über 8 Tage oder 1 mg verabreicht um 23:30 Uhr), (3) stärkere Antwort als normal auf Metyrapon- (Metopiron®) Stimulation sowie normale bzw. erhöhte Plasma-ACTH-Spiegel.⁴ Wird das Cushing-Syndrom durch primäre Nebennierentumoren (Adenom oder Karzinom) verursacht, funktionieren die Nebennieren unabhängig von ACTH und die hypophysäre ACTH-Sekretion wird supprimiert.^{5,6,7,8,9,10} Es kommt daher zu keiner Reaktion auf eine Dexamethason-Suppression oder eine Metyrapon-Stimulation. Diese Form des Cushing-Syndroms ist durch sehr niedrige bzw. nicht nachweisbare Konzentrationen von ACTH charakterisiert.

Aus diesem Grund ist die Messung des Plasma-ACTH für die Differentialdiagnose des hypophysären Cushing-Syndroms hilfreich. Bei Patienten mit Nebennierentumoren sind die ACTH-Konzentrationen niedrig. Hohe Konzentrationen an ACTH können bei Patienten mit ektopischem ACTH-Syndrom beobachtet werden. Patienten mit bilateraler Nebennierenhyperplasie weisen für ihren Grad an Hyperkortisolismus, der ACTH hemmen sollte, übermäßig hohe ACTH-Spiegel auf. In den meisten Fällen liegt die ACTH-Konzentration jedoch im Normbereich. Nebennierenrindeninsuffizienz oder inadäquate Kortisolproduktion können durch die Zerstörung der Nebennierenrinde oder Tumoren der Hypophyse oder des Hypothalamus verursacht sein, wodurch es zu einer inadäquaten ACTH-Produktion bzw. Freisetzung kommt. Die primäre Nebennierenrindeninsuffizienz, Morbus Addison, ist durch erheblich erhöhte Plasma-ACTH-Spiegel und ein Ausbleiben der Reaktion auf eine Stimulation der Nebennieren mit exogenem ACTH gekennzeichnet. Die sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienz, eine Unterfunktion der Hypophyse mit ACTH-Mangel, ist durch geringe Konzentrationen von Plasma-ACTH und Kortisol gekennzeichnet sowie eine subnormale, gewöhnlich jedoch erkennbare Reaktion auf eine Stimulation der Nebennieren mit synthetischem ACTH (Cortrosyn®). Wenn die Diagnose nur durch Auslösung einer künstlichen Hypoglykämie oder durch eine Metyrapon-Stimulation gestellt werden kann, fallen die ACTH- und Kortisol-Reaktionen schwächer als normal aus. Aggressive und invasive ACTH-produzierende Hypophysentumoren vor oder im Anschluss an eine bilaterale Adrenalektomie bei Cushing-Syndrom (Nelson-Tumor) zeichnen sich durch die Entwicklung einer Addison-Pigmentierung aus. Diese ist häufig bei Patienten zu beobachten, die nach einer Adrenalektomie im Rahmen einer Substitutionstherapie ausreichend Glucocorticoide zuführen. Bei diesen Patienten sind die Plasma-ACTH-Spiegel erheblich erhöht und reagieren kaum auf eine Dexamethason-Suppression.

4 TESTPRINZIP

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

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

In diesem Assay werden Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben gleichzeitig mit dem enzymgekoppelten Antikörper und einem Biotin-gekoppelten Antikörper in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatten inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation werden die Vertiefungen gewaschen, um nicht-gebundene Komponenten zu entfernen. Die an die feste Phase gebundenen Enzyme werden mit dem Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) inkubiert. Anschließend wird eine saure Stopp-lösung hinzugefügt, um die Reaktion anzuhalten. Die Färbung schlägt in gelb um. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration des ACTH in der Probe. Unter Verwendung der mit den Kalibratoren ermittelten Ergebnisse wird eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit Absorptionseinheiten gegenüber Konzentrationen erstellt. Die ACTH-Konzentrationen in Kontrollen und Patientenproben werden direkt aus dieser Kurve ermittelt.

5 TESTKIT-KOMPONENTEN

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

5.1 Weitere erforderliche, nicht im Lieferumfang enthaltene Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Lesegerät
- Mikrotiterplatten-Waschgerät [falls nicht verfügbar, ist manuelle Wäsche zulässig]
- Präzisionspipetten zur Pipettierung von 25, 200, 100 und 150 µL
- (*Optional*): Mehrkanaldispenser bzw. Repetierpipette für 25, 100 und 150 µL

6 WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Reagenzien dieses Testkits sind spezifisch so beschaffen, dass sie keine humanen Blutkomponenten enthalten. In den humanen Patientenproben kann das Vorhandensein von HBsAg, HBcAg bzw. HIV-Antikörpern jedoch nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potenziell infektiöses Material behandelt werden. Die bei ungetesteten Patientenproben üblichen Vorsichtsmaßnahmen gelten auch für den Umgang mit diesem Material. Die Stopplösung besteht aus 1 N saure Lösung. Dies ist eine starke Säure. Obwohl sie verdünnt ist, ist sie mit Sorgfalt zu handhaben. Sie kann Verätzungen verursachen. Handschuhe, Schutzbrille und entsprechende Schutzkleidung sind zu tragen. Verschüttete Säure ist vor dem Aufwischen mit großen Mengen Wasser zu verdünnen. Dämpfe nicht einatmen.

7 PROBENENTNAHME UND LAGERUNG

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

8 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

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

1. Alle Reagenzien mit Ausnahme der Nicht-Nullkalibratoren, Testkit-Kontrollen und dem Waschkonzentrat sind gebrauchsfertig. Alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C lagern.
2. Jeden der Nicht-Nullkalibratoren (Kalibrator B bis F) und die Testkit-Kontrollen 1 und 2 mit 2 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren und mischen. Flasche 10 Minuten ruhen lassen. Anschließend durch vorsichtiges Überkopfdrehen gründlich mischen, um eine vollständige Rekonstitution sicherzustellen. **Kalibratoren und Kontrollen sind nach Rekonstitution sobald wie möglich zu verwenden. Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-20 °C).** Standards und Kontrollen sind 6 Wochen nach Rekonstitution bei -20 °C stabil und können maximal dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, wenn die im Abschnitt „Verfahrenstechnische Hinweise“ gegebenen Empfehlungen beachtet werden.
3. **ELISA Reagenz A:** Waschkonzentrat: Inhalt gründlich mischen. Ist eine Niederschlagsbildung im Waschkonzentrat auf Grund einer Lagerung bei niedrigen Temperaturen wie 4 °C eingetreten, ist der Niederschlag durch Platzieren des Gefäßes in ein Wasserbad bei 37 °C oder einen Laborofen und zusätzliches Schwenken und Rühren aufzulösen. Waschkonzentrat (30 mL) zu 570 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser hinzufügen und mischen. Der verdünnte Waschpuffer ist bei Raumtemperatur 90 Tage stabil.

9 TESTVERFAHREN

1. Eine für alle sechs (6) Kalibratoren, A – F der ACTH -KALIBRATOREN [genaue Konzentrationen sind auf dem QC Datenblatt vermerkt], Kontrollen und Patientenproben ausreichende Anzahl Streptavidin-beschichteter Streifen in die Halterung einsetzen. Bitte verwenden Sie zwei Vertiefungen als "Leer". Siehe Schritt #9 dieses Abschnitts.
2. **200 µL** der Kalibratoren, Kontrollen und Proben in die dafür vorgesehene bzw. gekennzeichnete Vertiefung pipettieren. **Übrig bleibende Kalibratoren und Kontrollen sind nach Verwendung sobald wie möglich einzufrieren (-20 °C).**
3. **25 µL** des Reagenz 1 (biotinylierter Antikörper) in jede der Vertiefungen, die bereits die Kalibratoren, Kontrollen und Proben enthalten, pipettieren bzw. dispensieren.
4. **25 µL** des Reagenz 2 (enzymgekoppelter Antikörper) in dieselben Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Mikrotiterplatte(n) mit Aluminiumfolie oder einem Deckel abdecken, um Licht fernzuhalten. Platte **4 Stunden ± 30 Minuten** bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) auf einem **Orbitalschüttler oder Rotator** bei 170 ± 10 U/min inkubieren.
5. Flüssigkeit zunächst vollständig absaugen. Anschließend jede der Vertiefungen fünf (5) Mal mit dem verdünnten Waschpuffer (mit Reagenz A erstellt) in einem automatischen Waschgerät waschen/absaugen. Die Waschpuffer-Dispensionsmenge ist auf 0,35 mL je Vertiefung einzustellen.
6. **150 µL** des **ELISA Reagenz B** (TMB-Substratlösung) in jede der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren.
7. Mikrotiterplatte(n) mit einer entsprechenden Abdeckung zur Vermeidung von Lichteinstrahlung **30 ± 5 Minuten** bei Raumtemperatur (22 °C - 28 °C) auf einem **Orbitalschüttler oder Rotator** bei 170 ± 10 U/min inkubieren.
8. **100 µL** der Stopplösung in jede der Vertiefungen pipettieren bzw. dispensieren. Vorsichtig mischen.
9. Innerhalb von 10 Minuten Absorption der Lösung in den Vertiefungen bei **450 nm** im Mikrotiterplatten-Lesegerät. Vor dem Lesen, sichern dass benannte Vertiefungen als "Leer" (siehe Schritt #1) mit 250 µL destilliertes oder deionisiertes Wasser gefüllt sind. Anschließend noch einmal bei einer Wellenlänge von **405 nm**.
Hinweis: Die zweite Messung erfolgt, um die analytische Gültigkeit der Kalibrationskurve auf den höchsten Kalibratorwert (ca. 500 pg/mL) auszudehnen. Somit können Patientenproben mit ACTH > 150 pg/mL gegen eine Kalibrationskurve aus Messwerten bis zu der Konzentration, die dem höchsten Kalibrator entspricht, quantifiziert werden. Gemessen wird bei 405 nm, in sicherem Abstand von der Wellenlänge der maximalen Absorption. Im Allgemeinen sind Patienten- und Kontrollproben bei ACTH-Konzentrationen von bis zu 150 pg/mL bei 450 nm abzulesen. ACTH-Konzentrationen oberhalb von 150 pg/mL werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.
10. Unter Verwendung der im vorherigen Schritt ermittelten endgültigen Absorptionswerte kann eine Kalibrationskurve mittels kubischer Splines, 4-Parameter Logistik oder Punkt-zu-Punkt-Interpolation zur Quantifizierung der ACTH-Konzentration erstellt werden.

10 VERFAHRENSTECHNISCHE HINWEISE

- ACTH 1-39 ist ein sehr instabiles Molekül. Sofort nach Rekonstitution bzw. Auftauen sämtlicher Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben mit dem Test beginnen.
- Es wird empfohlen, alle Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben in Doppelbestimmung zu testen. Für die Datenreduktion und die Berechnung der Ergebnisse sind dann die mittleren Absorptionseinheiten der doppelbestimmten Reihen zu verwenden.
- Die Proben sollten bei minimaler Luftbildung in die Vertiefungen pipettiert werden. Dies wird durch Umkehren des Pipettiervorgangs erreicht, wie in der Pipetten-Packungsbeilage beschrieben.
- Patientenproben mit einer höheren Konzentration als der höchsten Kalibratorkonzentration (Kalibrator F) von ca. 500 pg/mL (genaue Konzentrationsangabe auf dem QC Datenblatt) sind mit Kalibrator A (Nullkalibrator) zu verdünnen und erneut zu testen. Das Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.
- Nur Reagenzien einer Charge verwenden.
- Alternativ können für den Test ausreichende Mengen Reagenz 1 (biotinylierter Antikörper) und Reagenz 2 (enzymgekoppelter Antikörper) zu gleichen Teilen in einer sauberen brauntransparenten Flasche gemischt werden. Anschließend 50 µL des Gemischs in jede Vertiefung pipettieren. Diese Methode ersetzt Schritt (3) und (4). Darauf folgt die Inkubation im Orbitalschüttler.
- Beim Mischen ist ein Verschütten der Reagenzien aus den Vertiefungen zu vermeiden. Sorgfältiges Arbeiten ist für die Präzision des Tests und die Zuverlässigkeit der Ergebnisse von großer Bedeutung.

11 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

11.1 Manuell

1. Erstellen einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Kalibrationskurve) für die Messung bei 450 nm unter Verwendung der ersten fünf im Testkit enthaltenen Kalibratoren, d.h. Kalibrator A, B, C, D und E. Erstellen einer zweiten Dosis-Wirkungs-Kurve für die Messung bei 405 nm unter Verwendung der drei Kalibratoren mit den höchsten Konzentrationen, d.h. Kalibrator D, E und F.
2. Jedem Kalibrator die auf dem QC Datenblatt in pg/mL angegebene Konzentration zuweisen. Daten der Kalibrationskurve auf Millimeterpapier übertragen, wobei die Konzentration auf der X-Achse gegen die entsprechende Absorptionseinheit auf der Y-Achse aufzutragen ist.
3. Zwei nebeneinander liegende Punkte sind durch eine Gerade zu verbinden. Dieser mathematische Algorithmus wird als lineare Interpolation bezeichnet. Die Probenkonzentration ist durch Feststellung der Absorptionseinheit auf der Y-Achse und des zugehörigen Konzentrationswerts auf der X-Achse zu ermitteln. Patienten- und Kontrollproben sind bei ACTH-Konzentrationen von bis zu 150 pg/mL bei 450 nm zu messen. ACTH-Konzentrationen oberhalb von 150 pg/mL werden aus der Kurve bei 405 nm interpoliert.

11.2 Automatisch

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

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

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

* Da die gemessene Konzentration > 150 pg/mL ist, sollten die bei 405 nm ermittelten Werte angegeben werden, die nachfolgend unter **Beispieldaten bei 405 nm** aufgeführt sind.

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

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

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

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

12 QUALITÄTSKONTROLLE

Kontrollplasmen oder Plasmapools sind in jedem Testlauf mit Kalibratoren und Patientenproben mitzuführen. Aus der Analyse der Kontrollproben gewonnene Ergebnisse sind mithilfe der entsprechenden statistischen Methoden auf ihre Akzeptanz auszuwerten. Liegen bei einem Test einer oder mehrere der Probenwerte für die Qualitätskontrolle außerhalb des Akzeptanzbereichs, sind die Ergebnisse der Patientenproben möglicherweise ungültig.

13 GRENZEN DES VERFAHRENS

Das ACTH ELISA Testkit zeigt keinen „High-dose-hook-Effekt“ bei Proben, die mit 20 000 pg/mL ACTH versetzt sind. Proben mit ACTH-Konzentrationen höher als die des höchsten Kalibrators sind jedoch zu verdünnen und erneut auf korrekte Werte zu testen. Wie jeder als diagnostisches Hilfsmittel verwendete Analyt sind ACTH-Ergebnisse sorgfältig unter Berücksichtigung des gesamten klinischen Erscheinungsbildes des Patienten und weiteren unterstützenden diagnostischen Tests zu interpretieren.

14 ERWARTETE WERTE

Mithilfe des ACTH ELISA (DE3647) wurden in den USA bei einhundertvierunddreißig (134) scheinbar gesunden Probanden ACTH-Konzentrationen gemessen. Die ermittelten Werte lagen in einem Bereich von 7,0 bis 63 pg/mL. Wird die Population logarithmisch transformiert, so folgt sie in ihrem statistischen Schiefe- und Exzessverhalten der Normal- oder Gauss-Verteilung. Das geometrische Mittel \pm 2 Standardabweichungen vom Mittelwert ergab einen Bereich von 6,17 bis 58,2 pg/mL.

15 LEISTUNGSMERKMALE

15.1 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit bzw. untere Nachweisgrenze dieses Tests ist als der kleinste Wert definiert, der auf Basis des 95%-Vertrauensbereichs vom Nullstandard unterschieden werden kann. Der ACTH ELISA hat eine berechnete Empfindlichkeit von 0,22 pg/mL.

Weitere Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung

16 REFERENCES / LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

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

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità