

# ACTH [Adrenocorticotropes Hormon] ELISA

Katalog-Nr. 7023

Spezifischer quantitativer Assay zur  
Bestimmung von ACTH im Plasma

September 2003



## I. VERWENDUNGSZWECK

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

## II. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

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

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

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

## III. KLINISCHE BEDEUTUNG

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

Das Cushing-Syndrom wird durch ein Überangebot von Glucocorticoiden verursacht. Alle Ursachen des Cushing-Syndroms, mit Ausnahme der therapeutischen Verabreichung von Glucocorticoiden, gehen mit erhöhten 24 h-Harn-Kortisolwerten einher. Die häufigste Ursache des Cushing-Syndroms ist die

bilaterale Nebennierenhyperplasie, verursacht durch eine hypophysäre ACTH-Hypersekretion (Morbus Cushing) eines Hypophysen-Adenoms oder einer corticotropen Hyperplasie.<sup>5,6,7,8,9,10</sup> Eine labortechnische Diagnose des Cushing-Syndroms wird durch folgende Beobachtungen bestätigt: (1) Suppression der Konzentrationen von Plasma-ACTH und Kortisol bei hochdosierter Gabe von Dexamethason (2,0 mg alle 6 Stunden über 8 Tage), (2) fehlende Suppression von ACTH und Kortisol bei geringdosierter Gabe von Dexamethason (0,5 mg alle 6 Stunden über 8 Tage oder 1 mg verabreicht um 23:30 Uhr), (3) stärkere Antwort als normal auf Metyrapon- (Metopiron®) Stimulation sowie normale bzw. erhöhte Plasma-ACTH-Spiegel.<sup>4</sup>

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

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

Nebennierenrindeninsuffizienz oder inadäquate Kortisolproduktion können durch die Zerstörung der Nebennierenrinde oder Tumoren der Hypophyse oder des Hypothalamus verursacht sein, wodurch es zu einer inadäquaten ACTH-Produktion bzw. Freisetzung kommt. Die primäre Nebennierenrindeninsuffizienz, Morbus Addison, ist durch erheblich erhöhte Plasma-ACTH-Spiegel und ein Ausbleiben der Reaktion auf eine Stimulation der Nebennieren mit exogenem ACTH gekennzeichnet. Die sekundäre Nebennierenrindeninsuffizienz, eine Unterfunktion der Hypophyse mit ACTH-Mangel, ist durch geringe Konzentrationen von Plasma-ACTH und Kortisol gekennzeichnet sowie eine subnormale, gewöhnlich jedoch erkennbare Reaktion auf eine Stimulation der Nebennieren mit synthetischem ACTH (Cortrosyn®). Wenn die Diagnose nur durch Auslösung einer künstlichen Hypoglykämie oder durch eine Metyrapon-Stimulation gestellt werden kann, fallen die ACTH- und Kortisol-Reaktionen schwächer als normal aus.

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

## IV. TESTPRINZIP

Der ACTH Immunoassay von Biomerica 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]

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

markiert.

In diesem Assay werden Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben gleichzeitig mit dem enzymgekoppelten Antikörper und einem Biotin-gekoppelten Antikörper in Streptavidin-beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatten inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation werden die Vertiefungen gewaschen, um nicht-gebundene Komponenten zu entfernen. Die an die feste Phase gebundenen Enzyme werden mit dem Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) inkubiert. Anschließend wird eine saure Stopplösung hinzugefügt, um die Reaktion anzuhalten. Die Färbung schlägt in gelb um. Die Farbtintensität 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.

## V. TESTKIT-KOMPONENTEN

Testkit-Komponenten	Bezeichnung	Menge
RGT 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 = ELISA Reagenz B	TMB-Substrat [Tetramethylbenzidin]	1 x 15 ml
SOLN = Stopplösung	ELISA Stopplösung [1 N Schwefelsäure]	1 x 20 ml
PLA = Mikrotiterplatte	Eine Halterung mit Streptavidin-beschichteten Streifen	12 Streifen à 8 Vertiefungen
CAL = Kalibratoren A: 0 pg/ml Genauere Konzentrationen D: auf Flaschenetiketten	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 Genauere Bereiche auf Flaschenetiketten	Lyophilisiert. 2 Level. Synthetisches h-ACTH 1-39 in BSA/Pferdeserum-Lösung.	1 x 2 ml je Level

## 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

## VI. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

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

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

## VII. 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 violetterm 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 2-8°C bis zu 8 Stunden gelagert werden. Auf -20°C tiefgefrorene EDTA-Plasmaproben sind bis zu 4 Monate stabil.

## VIII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

Alle Testkit-Komponenten bei 2-8°C lagern mit Ausnahme von Waschkonzentrat und Stopplösung.

1. Alle Reagenzien mit Ausnahme der Nicht-Nullkalibratoren, Testkit-Kontrollen und dem Waschkonzentrat sind gebrauchsfertig. Alle Reagenzien bei 2-8°C lagern mit Ausnahme des Waschkonzentrats, das bis zum Zeitpunkt der Verdünnung bei Raumtemperatur aufzubewahren ist, um eine Niederschlagsbildung zu vermeiden.
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.

## IX. TESTVERFAHREN

1. Eine für alle sechs (6) ACTH-Kalibratoren, A – F der ACTH-KALIBRATOREN [genaue Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten vermerkt], Qualitätskontrollplasma und Patientenproben ausreichende Anzahl **Streptavidin-beschichteter Streifen** in die Halterung einsetzen.
2. **200 µl** der Probe 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 Probe 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°-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°-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 gegen 250 µl destilliertes oder deionisiertes Wasser messen. Anschließend **noch einmal** bei einer Wellenlänge von **405 nm** gegen destilliertes oder deionisiertes Wasser **messen**.  
*Hinweis: Die zweite Messung erfolgt, um die analytische Gültigkeit der Kalibrationskurve auf den höchsten Kalibratorwert (ca. 500 pg/ml) auszuweiten. 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.

## VERFAHRENSTECHNISCHE HINWEISE

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

Orbitalschüttler.

- Beim Mischen ist ein Verschütten der Reagenzien aus den Vertiefungen zu vermeiden. Sorgfältiges Arbeiten ist für die Präzision des Tests und die Zuverlässigkeit der Ergebnisse von großer Bedeutung.

## X. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

### Manuell

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

### 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-Anzugebendes 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.

## XI. 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.

## XII. GRENZEN DES VERFAHRENS

Das Biomerica 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.

## XIII. ERWARTETE WERTE

Mithilfe des Biomerica ACTH ELISA wurden in den USA bei dreiundachtzig (83) scheinbar gesunden Probanden ACTH-Konzentrationen gemessen. Die ermittelten Werte lagen in einem Bereich von 7,9 bis 66,1 pg/ml. Wird die Population logarithmisch transformiert, so folgt sie in ihrem statistischen Schiefe- und Exzessverhalten der Normal- oder Gauss-Verteilung, wie in den Histogrammen dargestellt. Das geometrische Mittel  $\pm$  2 Standardabweichungen vom Mittelwert ergab einen Bereich von 8,3 bis 57,8 pg/ml.

## XIV. LEISTUNGSMERKMALE

### Genauigkeit

Hundertsiebzehn (117) Patientenproben mit ACTH-Werten zwischen 1,5 und 1045 pg/ml wurden mit dem Biomerica ELISA Verfahren und dem immunoradiometrischen Assay (IRMA) getestet. Aus der linearen Regressionsanalyse ergeben sich die folgenden statistischen Werte:

$$\text{Biomerica ELISA} = 0,976 \text{ IRMA Testkit} + 4,2 \text{ pg/ml}$$

$$r = 0,995 \quad N = 117$$

### 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 Biomerica ACTH ELISA hat eine berechnete Empfindlichkeit von 0,46 pg/ml.

### Präzision und Reproduzierbarkeit

Die Präzision (Intra-Assay-Abweichung) des Biomerica ACTH ELISA wurde durch 21 wiederholte Messungen jeder der beiden Proben ermittelt.

#### Intra-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert (pg/mL)	N	Variations – Koeffizient %
A	35,7	21	3,1
B	255,0	21	4,2

Die Gesamtpräzision (Inter-Assay-Abweichung) des Biomerica ACTH ELISA wurde durch die Bestimmung von zwei Proben in 35 Testansätzen ermittelt. Die Tests wurden über einen Zeitraum von neun Wochen von drei Labortechnikern unter Verwendung von Reagenzien aus drei verschiedenen Chargen durchgeführt.

#### Inter-Assay-Abweichung

Probe	Mittelwert (pg/mL)	N	Variations – Koeffizient %
A	35,2	35	5,8
B	230,0	35	6,2

### Spezifität und Querempfindlichkeit

Die Querempfindlichkeit im ACTH ELISA wurde durch Zusatz unterschiedlicher Mengen verschiedener Verbindungen zu einem ACTH-Standard untersucht. Die folgenden Ergebnisse wurden ermittelt:

Kreuzreaktant	Konzentration Des Kreuzreaktants	ACTH ohne Kreuzreaktant [pg/ml]	ACTH Mit Kreuzreaktant [pg/ml]	Veränderung von ACTH [pg/ml]	% Querempfindlichkeit
ACTH (1-24)	100 000 pg/ml	74,5	3,1	-71,4	-0,07 %
	10 000 pg/ml	74,5	17,1	-57,4	-0,57 %
	1000 pg/ml	74,5	60,9	-13,6	-1,36 %
	200 pg/ml	74,5	68	-6,5	-3,25 %
ACTH (18-39)	5000 pg/ml	67	19	-48	-0,96 %
	2000 pg/ml	67	26,8	-40,2	-2,01 %
	500 pg/ml	67	43,3	-23,7	-4,74 %
a-MSH	100 000 pg/ml	72,3	1,3	-71	-0,07 %
	10 000 pg/ml	72,3	9,8	-62,5	-0,63 %
	1000 pg/ml	72,3	44,5	-27,8	-2,78 %
	200 pg/ml	72,3	61	-11,3	-5,65 %
b-ENDORPHIN	100 000 pg/ml	76,3	69,3	-7	-0,01 %
	50 000 pg/ml	76,3	73,5	-2,8	-0,01 %

### Wiederfindung

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

Plasma-probe	ACTH Endogenes (pg/ml)	ACTH zugesetzt (pg/ml)	Erwarteter Wert (pg/ml)	Gemessener Wert (pg/ml)	Wiederfindung (%)
A	23,3	--	--	--	--
	21,0	50,0	71,0	75,0	105,6 %
	18,6	100,0	118,6	126,0	106,2 %
B	28,1	--	--	--	--
	25,3	50,0	75,3	80,7	107,2 %
	22,5	100,0	122,5	142,0	115,9 %
C	21,8	--	--	--	--
	19,6	50,0	69,6	67,6	97,1 %
	17,4	100,0	117,4	125,0	106,4 %
D	9,8	--	--	--	--
	8,8	50,0	58,8	51,6	87,7 %
	7,8	100,0	107,8	96,4	89,4 %

### Kinetischer Effekt des Assays

Um einen systematischen kinetischen Effekt auszuschließen, wurden am Anfang, in der Mitte und am Ende der gesamten Mikrotiterplatte [mit 12 Streifen à 8 Vertiefungen, d.h. 96 Vertiefungen] drei „gespikete“ Patientenpools pipettiert. Die Auswahl der Pools erfolgte im Sinne eines guten Querschnitts der enthaltenen ACTH-Konzentrationen.

### Linearität von Patientenprobenverdünnungen: Parallelität









Fünf Patientenplasma-proben wurden mit Kalibrator A (Nullkalibrator) verdünnt. Die Ergebnisse sind nachfolgend in pg/ml dargestellt:

Probe	Verdünnung	Erwartet pg/mL	Beobachtet pg/mL	% Beobachtet ÷ Erwartet
A	Unverdünnt	-	236,0	-
	1:2	118,0	110,0	93 %
	1:4	59,0	54,9	93 %
	1:8	29,5	26,3	89 %
B	Unverdünnt	-	193,0	-
	1:2	96,5	101,0	105%
	1:4	48,3	44,9	93 %
1:8	24,1	23,9	99 %	
C	Unverdünnt	-	264,0	-
	1:2	132,0	128,0	97 %
	1:4	66,0	53,5	81 %
1:8	33,0	25,2	76 %	
D	Unverdünnt	-	>1000	-
	1:2	-	306,0	-
	1:4	153,0	162,0	106 %
	1:8	76,5	77,6	101 %
1:16	38,3	41,7	109 %	
D	Unverdünnt	-	>1000	-
	1:2	-	423,0	-
	1:4	212,0	217,0	103 %
	1:8	106,0	109,	103 %
1:16	52,9	49,2	93 %	

### XV. LITERATURANGABEN:

- Ryan, WG: Endocrine Disorders – A Pathophysiologic Approach, 2nd Edition Year Book Medical Publishers, Inc. 1980.
- Watts, N.B., J.H. Keffer: Practical Endocrine Diagnosis, Third Edition, Lea and Febioer, 1982.
- Ganong, WF, L.D. Alber, TC Lee: ACTH and the Regulation of Adrenocortical Secretion, N. Engl. J. Med. 290 : 1006, 1974.
- Tepperman, J: Metabolic and Endocrine Physiology, 4th Edition, Year Book Medical Publishers, Inc., 1981.
- 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.
- Radioimmunoassay Manual, Edited by A.L. Nichols and J.C. Nelson, 4th Edition Nichols Institute, 1977.
- Gold, E.M.: The Cushing's Syndromes: Changing Views of Diagnosis and Treatment. Ann Intern. Med. 90:829, 1979.
- Plasma Cortisol, RIA for Physicians, Edited by J.C. Travis, 1:8, Scientific Newsletter, Inc. 1976.
- Krieger, D.T.: Physiopathology of Cushing's Disease, Endocrine Review 4:22-43, 1983.
- 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.

### XVI. SYMBOLE

	Lagerungstemperatur
	Stapelcode
	Ablauf
	Hersteller
	Autorisierter Vertreter
	Achtung, Siehe Anweisungen
	Für die <i>in vitro</i> -Diagnostik vorgesehen
	Katalog-Nr.

### XVII. BEZUGSNACHWEIS

BESTELLUNGEN: Bestellungen sind zu richten an:

BIOMERICA, INC.  
1533 Monrovia Avenue  
Newport Beach, CA 92663  
U.S.A.

Telefon: +1-(949) 645-2111  
Fax: +1-(949) 722-6674  
Website: www.biomerica.com  
E-Mail: bmra@biomerica.com

67023\_ger.doc  
2003

September



“Autorisierter Vertreter”  
gemäß IVDD 98/79/ EC  
MDSS  
Burckhardtstraße 1  
30163 Hannover, Deutschland