

# ACTH [Hormone corticotrope]

## ELISA

REF 7023

### Dosage quantitatif spécifique de l'hormone corticotrope dans le plasma

janvier 2018



#### I. APPLICATION

Le test ACTH ELISA de Biomerica sert à déterminer la quantité d'ACTH (hormone corticotrope) dans le plasma humain. Ce dosage sert uniquement à un diagnostic *in vitro*.

#### II. RÉSUMÉ ET EXPLICATION

L'ACTH (hormone corticotrope) ou corticotrophine est une hormone composée d'un peptide de 39 acides aminés (PM = 4500) sécrétée par la glande pituitaire pour réguler la production d'hormones stéroïdes par le cortex surrénal. La sécrétion d'ACTH par l'antéhypophyse est déterminée à la fois par un mécanisme de rétrocontrôle négatif classique et un système de contrôle induit par le stress au niveau du système nerveux central<sup>1</sup>. Divers types de stress ou de douleur perçus dans des parties supérieures du cerveau modulent la sécrétion de l'hormone neurosécrétoire de l'hypothalamus, la corticolibérine ou CRH, un peptide de 41 acides aminés. La CRH stimule la sécrétion d'ACTH pituitaire qui est régulée également par un deuxième peptide, la vasopressine (AVP). La sécrétion d'AVP est stimulée aussi par le stress et agit en synergie avec la CRH pour augmenter la sécrétion d'ACTH dans la circulation porte pituitaire. ACTH favorise la synthèse et la libération de tous les stéroïdes surrénaux, de l'aldostérone, du cortisol et des androgènes surrénaux. C'est le principal régulateur du cortisol, le plus important glucocorticoïde chez l'homme. Lorsque le taux de cortisol augmente dans le sang, la libération d'ACTH est directement inhibée au niveau pituitaire. Par le même mécanisme, la diminution du taux de cortisol entraîne l'augmentation de celui de l'ACTH.<sup>2,3,4,5</sup>

L'ACTH biologiquement active est issue du clivage enzymatique d'une grosse molécule précurseur, la proopiomélanocortine (POMC). Cette molécule contient dans sa structure les séquences d'acides aminés de l'ACTH, de la pro-ACTH, de l'hormone stimulatrice des bêta-mélanocytes, de la lipotropine ainsi que de l'endorphine et les enképhalines. Comme la réaction dans les dosages immunologiques est déterminée par la structure antigénique et non par la fonction biologique, le dosage radio-immunologique normal de l'ACTH réagit avec la POMC, la pro-ACTH, l'ACTH et certains fragments de l'ACTH<sup>3</sup>.

Similaire à d'autres hormones pituitaires, l'ACTH est sécrétée de manière pulsatile. Ces petites pulsations sont superposées à une fluctuation diurne caractéristique de plus grande amplitude. Chez les individus sains, l'ACTH atteint un pic tôt le matin (entre 6h et 8h) et enregistre les taux les plus bas en soirée et au début du sommeil. En raison de ce rythme diurne, on prélève d'habitude les échantillons d'ACTH plasmatique entre 8h et 10h. Toutefois, on peut prélever des échantillons en fin d'après-midi (entre 16h et 18h) pour mieux distinguer les patients atteints de la maladie de Cushing des individus sains. Ceci est possible car le mode diurne de sécrétion d'ACTH est généralement absent dans le cas de maladie de Cushing et de syndromes de sécrétion ectopique d'ACTH. Le stress peut également annuler ce rythme diurne.

#### III. IMPORTANCE CLINIQUE

Les dosages d'ACTH plasmatique servent à distinguer entre la maladie de Cushing pituitaire, la maladie d'Addison, les tumeurs pituitaires produisant de l'ACTH de façon autonome (par ex., le syndrome de Nelson), l'hypopituitarisme avec une déficience en ACTH et le syndrome de sécrétion ectopique d'ACTH.<sup>5,6,7,8,9,10</sup>

Le syndrome de Cushing est provoqué par un excès des actions des glucocorticoïdes. Toutes les causes du syndrome de Cushing, à l'exception de la médication à base de glucocorticoïde, sont associées à une augmentation du cortisol urinaire de 24 heures. Le syndrome de Cushing dérive, le plus souvent, d'une hyperplasie surrénale bilatérale, due à une hypersécrétion d'ACTH pituitaire (maladie de Cushing) à partir d'un adénome pituitaire ou d'une hyperplasie corticotrophe<sup>5,6,7,8,9,10</sup>. Le diagnostic en laboratoire de la maladie de Cushing s'appuie sur les observations suivantes : (1) suppression des concentrations de cortisol et d'ACTH plasmatiques par administration de dose élevée (2,0 mg q 6h x 8) de dexaméthasone, (2) l'ACTH et le cortisol sont toujours présents lors de l'ajout de faibles doses (0,5 mg q 6h x 8 ou 1 mg administrée à 23h30) de dexaméthasone, (3) réponse excédant la normale à un test de stimulation à la métyrapone (Métopirone) et taux d'ACTH plasmatique normaux ou élevés.<sup>4</sup>

Quand le syndrome de Cushing est causé par une anomalie surrénale primaire (adénome ou carcinome), la glande surrénale agit indépendamment de l'ACTH et la sécrétion d'ACTH pituitaire est supprimée.<sup>5,6,7,8,9,10</sup> Il n'y a alors aucune réaction à la suppression de dexaméthasone ou à la stimulation par la métyrapone. Ce type de syndrome de Cushing est caractérisé par des taux d'ACTH très bas ou imperceptibles.

Dans ce cas, le dosage de l'ACTH plasmatique s'avère fort utile puisqu'il permet d'effectuer le diagnostic différentiel du syndrome de Cushing pituitaire. En effet, chez les patients souffrant de tumeurs surrénales, le taux d'ACTH est bas, alors qu'il est élevé chez les patients atteints du syndrome de sécrétion ectopique d'ACTH. Chez les patients souffrant d'une hyperplasie surrénale bilatérale, on observe un taux d'ACTH très élevé compte-tenu de leur degré d'hypercortisolisme qui devrait supprimer l'ACTH. Dans la plupart des cas, cependant, la concentration d'ACTH reste dans les limites normales.

Une insuffisance corticosurrénale ou une production de cortisol inadéquate peut être due à la destruction du cortex surrénal ou à des anomalies de la glande pituitaire ou hypothalamus, qui entraînent une production ou une libération inadéquate de l'ACTH.<sup>5,6,7,8,9,10</sup> L'insuffisance corticosurrénale primaire ou maladie d'Addison est caractérisée par des taux très élevés d'ACTH dans le plasma et par l'absence de réponse surrénale à une stimulation par l'ACTH exogène. L'hypopituitarisme accompagné d'un faible taux d'ACTH (ou insuffisance corticosurrénale secondaire) est caractérisé par de faibles concentrations de cortisol et d'ACTH dans le plasma et par une réaction surrénale, inférieure à la normale mais généralement distincte, à une stimulation par l'ACTH synthétique (Cortrosyn<sup>®</sup>). Si le stress hypoglycémique ou une stimulation par la métyrapone sont nécessaires pour le diagnostic, les réponses de l'ACTH et du cortisol sont inférieures à la normale.

Les tumeurs pituitaires, agressives et invasives, produisant de l'ACTH et apparaissant avant ou après une surrenalectomie bilatérale pour la maladie de Cushing (syndrome de Nelson) sont caractérisées par le développement de la pigmentation addisonienne, fréquente chez un patient qui suit une thérapie de remplacement des glucocorticoïdes, après avoir subi cette intervention chirurgicale. Chez ces patients, les taux d'ACTH plasmatique sont remarquablement élevés et ne réagissent pas bien à la suppression de dexaméthasone.

#### IV. PRINCIPE DU TEST

Le dosage immunologique ACTH de Biomerica est un test ELISA [Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay] à deux sites (« en sandwich »), servant à mesurer la chaîne d'ACTH biologiquement active, constituée de 39 acides aminés. Un anticorps polyclonal de chèvre anti-ACTH humaine, purifié par chromatographie d'affinité et un anticorps monoclonal de souris anti-ACTH humaine sont appliqués spécifiquement à des régions bien définies de la molécule d'ACTH. Un des anticorps, biotinylé, est préparé pour se lier uniquement à la séquence 34 à 39 de l'ACTH dans le fragment C-terminal. L'autre anticorps est préparé pour se lier uniquement à la section 1 à 24 de l'ACTH dans les fragments N-terminal et région centrale et est marqué à la peroxydase de raifort (HRP) pour la détection.

Puits recouvert de Streptavidine - Anti-ACTH (34-39) biotinylé -- ACTH --  
Conjugué HRP-Anti-ACTH (1-24)

Dans ce dosage, les étalons, les contrôles ou les échantillons des patients ont été simultanément incubés avec l'anticorps marqué à l'enzyme et avec un anticorps couplé à la biotine dans un puits à microplaques recouvert de streptavidine. À la fin de l'incubation, les composants libres sont retirés du puits par lavage et l'enzyme liée à la phase solide est incubée avec le substrat, le tétraméthylbenzidine (TMB). On ajoute alors une solution bloquante acide pour arrêter la réaction dont la couleur devient jaune. L'intensité de la couleur jaune est directement proportionnelle à la concentration en ACTH dans l'échantillon. À l'aide des résultats fournis par les étalons, on crée une courbe dose-réponse indiquant l'unité d'absorbance en fonction de la concentration. Les concentrations d'ACTH présentes dans les contrôles et les échantillons des patients sont directement déterminées à partir de cette courbe.

#### V. ÉLÉMENTS DE LA TROUSSE

Éléments de la trousse	Description	Quantité
RGT 1 = Réactif 1	Anticorps anti-ACTH biotinylé [anticorps de chèvre anti-ACTH humaine purifié par affinité]	1 x 2,7 ml
RGT 2 = Réactif 2	Anticorps anti-ACTH marqué à l'enzyme peroxydase [monoclonal de souris anti-ACTH humaine]	1 x 2,7 ml
RGT A = Réactif A ELISA	Solution concentrée de lavage ELISA [saline avec surfactant]	1 x 30 ml
RGT B = Réactif B ELISA	Substrat TMB [tétraméthylbenzidine]	1 x 15,5 ml

<b>SOLN</b> = Solution bloquante	Solution bloquante ELISA (acide sulfurique 1N)	1 x 20 ml
<b>PLA</b> = Microplaque	Un support avec des bandelettes recouvertes de streptavidine.	12 x 8 bandelettes de puits
<b>CAL</b> = Étalons A : 0 pg/ml B : Voir les concentrations C : exactes sur les étiquettes des tubes D : E : F :	ACTH humaine synthétique lyophilisée [sauf l'étalon zéro] L'étalon zéro [solution BSA avec du sérum de cheval] est sous forme liquide prête à l'emploi. Tous les autres étalons consistent en ACTH humaine synthétique (1-39) dans une solution BSA avec du sérum de cheval	1 x 4 ml pour l'étalon zéro  1 x 2 ml pour tous les autres étalons
<b>CTRL</b> = Contrôles 1 et 2 Voir les limites exactes sur les étiquettes des tubes	Lyophilisés. 2 niveaux. ACTH humaine synthétique (1-39) dans une solution BSA avec du sérum de cheval	1 x 2 ml par niveau

## MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Lecteur de microplaques.
- Laveur de microplaques [sinon, un lavage manuel peut être acceptable].
- Pipettes de précision pour 25, 200, 100 et 150 µl.
- (*Facultatif*) : Distributeur multi-canaux ou à répétition pour 25, 100 et 150 µl.
- Agitateurs pour microplaques : Biomerica a mis au point des agitateurs aux diamètres indiqués ci-dessous ; les kits de streptavidine assureront une réponse de performance optimale aux réglages de la vitesse suivants :

Agitateurs pour microplaques	Diamètre d'agitation	Réglage de la vitesse
Orbital	3 mm (0.1118 in)	600 ± 10 tr/min
	19 mm (0.75 in)	170 ± 10 tr/min
Linéaire	25 mm (0.98 in)	170 ± 10 tr/min

## VI. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Bien que les réactifs fournis dans cette trousse aient été spécifiquement composés pour ne pas contenir d'éléments de sang humain, les échantillons de patients humains, qui peuvent être positifs aux anticorps HBsAg, HBcAg ou VIH, doivent impérativement être traités comme des risques biologiques potentiellement infectieux. Les précautions d'usage pour la manipulation d'échantillons de patients non testés doivent être suivies.

La solution bloquante consiste en acide sulfurique 1N. Il s'agit d'un acide corrosif. Quoique dilué, il doit être manipulé avec soin. Il est conseillé de porter des gants, des lunettes de sécurité et des vêtements de protection appropriés pour éviter tout risque de brûlure. Laver immédiatement tout acide déversé avec de grandes quantités d'eau. Ne pas respirer la vapeur et éviter l'inhalation.

Divers types d'agitateurs dotés de caractéristiques techniques différentes sont disponibles dans le commerce. Au cas où l'agitateur pour microplaques ne se situait pas entre les valeurs indiquées ci-dessus, chaque laboratoire est encouragé à définir ses propres limites optimales.

## VII. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Le dosage de l'ACTH doit être effectué avec du plasma EDTA. Il est nécessaire de disposer de 400 µl de plasma EDTA pour pouvoir doser l'échantillon en double exemplaire. Prélever le sang entier dans un tube [EDTA] couleur lavande. Séparer le plasma avec une centrifugeuse réfrigérée de préférence et conserver à une température inférieure ou égale à -20 °C. Les échantillons de plasma EDTA peuvent être conservés jusqu'à 8 heures entre 2° et 8 °C. S'ils sont congelés à -20 °C, ils restent stables jusqu'à 4 mois.

## VIII. PRÉPARATION ET CONSERVATION DES RÉACTIFS

*Conserver tous les éléments de la trousse entre 2° et 8 °C.*

1. Tous les réactifs à l'exception des étalons distincts de zéro, des contrôles et de la solution concentrée de lavage sont prêts à l'emploi. Conserver tous les réactifs entre 2° et 8 °C.
2. Reconstituer chaque fiole de chacun des étalons distincts de zéro (étalons B à F) et des contrôles 1 et 2 de la trousse avec 2 ml d'eau distillée ou déminéralisée et mélanger. Laisser reposer pendant 10 minutes, puis mélanger complètement par retournements pour obtenir une reconstitution totale. **Utiliser les étalons et les contrôles dès que possible après reconstitution. Congeler (à -20 °C) les étalons et contrôles restants dès que possible après emploi.** Les normes et les contrôles demeurent stables à -20 °C pendant 6 semaines après reconstitution et supportent jusqu'à 3 cycles de congélation-décongélation, s'ils sont manipulés conformément aux instructions de la section « Remarques sur les procédures ».
3. **Réactif A ELISA** : Solution concentrée de lavage : Bien mélanger le contenu de

la solution concentrée de lavage. Si un précipité apparaît dans cette solution après conservation à basse température, par exemple 4 °C, le dissoudre en plaçant la fiole dans un bain-marie ou un four à 37 °C et en agitant le contenu. Ajouter la solution concentrée de lavage (30 ml) à 570 ml d'eau distillée ou déminéralisée et mélanger. La solution de lavage active diluée est stable pendant 90 jours si elle est conservée à température ambiante.

## IX. PROCÉDURE DE DOSAGE

1. Placer un nombre suffisant de bandelettes recouvertes de streptavidine dans un support pour tester tous les six (6) étalons d'ACTH, ÉTALONS A à F d'ACTH (la concentration exacte est indiquée sur l'étiquette de la fiole), les sérums de contrôle qualité et les échantillons de patients. Au minimum, désigner deux puits pour servir de « blancs ». Se référer à l'étape 9 pour la lecture finale de la plaque.
2. Piper **200 µl** d'étalons, de contrôles et d'échantillons dans le puits approprié. **Congeler (à -20 °C) les étalons et contrôles restants dès que possible après emploi.**
3. Ajouter ou administrer **25 µl** de Réactif 1 (anticorps biotinylé) dans chaque puits contenant les étalons, les contrôles et les échantillons.
4. Ajouter ou administrer **25 µL** de Réactif 2 (anticorps marqué à l'enzyme) dans chacun des mêmes puits. Recouvrir la plaque ou les plaques d'une feuille d'aluminium ou avec un plateau afin d'éviter l'exposition à la lumière. Les placer sur un **agitateur** ajusté aux réglages recommandés (voir la section V) pendant **4 heures ± 30 minutes** à température ambiante (22 °C-28 °C).
5. Aspirer tout le fluide, puis laver ou aspirer chaque puits cinq (5) fois avec la solution de lavage active (préparée avec le Réactif A) dans un laveur de microplaques automatique. Il est recommandé de limiter le volume de solution de lavage à verser dans chaque puits à 0,35 ml.
6. Ajouter ou administrer **150 µl** de **réactif B ELISA** (substrat TMB) dans chacun des puits.
7. Après avoir recouvert la plaque ou les plaques afin d'éviter l'exposition à la lumière, la (ou les) placer les microplaques sur un **agitateur** ajusté aux réglages recommandés (voir la section V) pendant **30 ± 5 minutes** à température ambiante (22 °C-28 °C).
8. Ajouter ou administrer **100 µl** de solution bloquante dans chacun des puits. Mélanger délicatement.
9. Lire l'absorbance de la solution dans les puits au bout de 10 minutes avec un lecteur de microplaques réglé à 450 nm par rapport à 250 µl d'eau distillée ou déminéralisée. Avant la lecture, s'assurer que les deux « puits blancs » mentionnés à l'étape sont remplis de 250 µl d'eau distillée ou déminéralisée. Lire la plaque une autre fois avec le lecteur réglé à 405 nm si on utilise de l'eau distillée ou déminéralisée.  
*Remarque : La deuxième lecture permet d'étendre la validité analytique de la courbe d'étalonnage jusqu'à la valeur la plus élevée représentée par un étalon, qui est d'environ 500 pg/ml. En conséquence, les échantillons de patients ayant une ACTH > 150 pg/ml peuvent être quantifiés et comparés à toutes les valeurs indiquées par la courbe d'étalonnage jusqu'à celle de la concentration la plus élevée, à l'aide de la lecture à 405 nm, loin de la longueur d'onde de l'absorbance maximale. En général, il est conseillé de lire les échantillons de patients et de contrôles avec un lecteur réglé sur 450 nm pour les concentrations d'ACTH ne dépassant pas 150 pg/ml. Les concentrations d'ACTH supérieures à 150 pg/ml doivent être interpolées avec une lecture à 405 nm.*
10. A partir des valeurs finales d'absorbance obtenues dans l'étape précédente, tracer une courbe d'étalonnage utilisant une interpolation par spline cubique, par 4 PL ou point à point pour quantifier la concentration d'ACTH.

## REMARQUES SUR LES PROCÉDURES

- L'ACTH 1-39 est une molécule très labile. Effectuer le dosage immédiatement après la reconstitution ou la décongélation de tous les étalons, contrôles et échantillons de patients.
- Il est recommandé d'exécuter tous les dosages en double exemplaire. Utiliser ensuite la moyenne des unités d'absorbance des deux séries d'exemplaires pour réduire les données et calculer les résultats.
- Il est conseillé d'éviter la formation de bulles lorsqu'on pipette les échantillons dans le puits. Pour ce faire, suivre la méthode de « pipetage à l'envers » décrite dans la notice incluse dans l'emballage des pipettes.
- Les échantillons de patients dont les valeurs sont supérieures à celles de l'étalon le plus élevé (étalon F), environ 500 pg/ml (voir la concentration exacte sur l'étiquette de la fiole), peuvent être dilués avec l'étalon A (étalon zéro) et dosés à nouveau. Multiplier le résultat par le facteur de dilution.
- Ne pas mélanger les réactifs provenant de lots différents.
- De préférence, mélanger des volumes égaux de Réactif 1 (anticorps biotinylé) et de Réactif 2 (anticorps marqué à l'enzyme) et en quantités suffisantes pour le dosage dans un flacon propre de couleur ambre. Verser ensuite 50 µl de ce mélange dans chaque puits. Cette méthode remplace les étapes 3 et 4 de l'autre procédure et doit être suivie de l'incubation dans un agitateur orbital.
- Pendant le mélange, évitez toutes éclaboussures de réactifs hors des puits. Ceci risque d'altérer la précision.

## X. CALCUL DES RÉSULTATS

### Méthode manuelle

- Pour les lectures à 450 nm, tracer une courbe dose-réponse (courbe d'étalonnage) à partir des valeurs des cinq premiers étalons fournis, soit les étalons A, B, C, D et E. Pour les lectures à 405 nm, élaborer une deuxième courbe dose-réponse avec les trois étalons ayant les concentrations les plus élevées, soit les étalons D, E et F.
- Attribuer la concentration indiquée sur le tube en pg/ml à chaque étalon. Reporter les données de la courbe d'étalonnage sur du papier millimétré où l'axe X représentera la concentration et l'axe Y l'unité d'absorbance correspondante.
- Tracer une ligne droite entre 2 points adjacents. Cet algorithme mathématique est appelé couramment le calcul « point à point ». Obtenir la concentration de l'échantillon en repérant l'unité d'absorbance sur l'axe Y et la valeur de concentration correspondante sur l'axe X. En général, il est conseillé de lire les échantillons de patients et de contrôles avec un lecteur réglé sur 450 nm pour les concentrations d'ACTH ne dépassant pas 150 pg/ml. Les concentrations d'ACTH supérieures à 150 pg/ml doivent être interpolées avec une lecture à 405 nm.

### Méthode automatique :

Les programmes informatiques utilisant une courbe spline cubique ou 4 PL ou une méthode point à point donnent généralement des résultats convenables.

**Données d'échantillon à 450 nm** [lecture de l'unité d'absorbance brute par rapport à l'eau distillée ou déminéralisée]

Puits à microplaques	1 <sup>ère</sup> lecture Unité d'absorbance	2 <sup>ème</sup> lecture Unité d'absorbance	Moyenne Unité d'absorbance	ACTH pg/ml	ACTH pg/ml – Résultat à reporter
Étalon A	0,020	0,018	0,019		0
Étalon B	0,077	0,074	0,076		5
Étalon C	0,221	0,229	0,225		18
Étalon D	0,624	0,692	0,685		55
Étalon E	1,802	1,934	1,868		165
Contrôle 1	0,417	0,398	0,408	33,5	33,5
Contrôle 2	2,868	2,774	2,821	> 150	*
Échantillon du patient 1	0,072	0,078	0,075	4,9	4,9
Échantillon du patient 2	0,185	0,177	0,181	14,0	14,0
Échantillon du patient 3	0,495	0,491	0,493	40,8	40,8
Échantillon du patient 4	2,090	2,122	2,106	> 150	*

\* La concentration lue étant > 150 pg/ml, il est recommandé d'utiliser les données obtenues à 405 nm reportées dans le tableau ci-après, **Données d'échantillon à 405 nm**.

**Données d'échantillon à 405 nm** [lecture de l'unité d'absorbance brute par rapport à l'eau distillée ou déminéralisée]

Puits à microplaques	1 <sup>ère</sup> lecture Unité d'absorbance	2 <sup>ème</sup> lecture Unité d'absorbance	Moyenne Unité d'absorbance	ACTH pg/ml	ACTH pg/ml – Résultat à reporter
Étalon A	0,011	0,008	0,0095		0
Étalon D	0,032	0,032	0,032		55
Étalon E	0,074	0,081	0,078		165
Étalon F	1,838	1,817	1,828		500
Contrôle 1	0,138	0,132	0,135	< 150	¶
Contrôle 2	0,921	0,894	0,908	256	256
Échantillon du patient 1	0,030	0,032	0,031	< 150	¶
Échantillon du patient 2	0,068	0,062	0,065	< 150	¶
Échantillon du patient 3	0,165	0,159	0,162	< 150	¶
Échantillon du patient 4	0,663	0,677	0,670	188	188

¶ Pour les échantillons dont la lecture est < 150 pg/ml, il est recommandé d'utiliser les données obtenues à 450 nm reportées dans le tableau précédent, **Données d'échantillon à 450 nm**. Cette procédure devrait donner les résultats avec la meilleure sensibilité du dosage.

**REMARQUE :** Les données présentées le sont à titre indicatif et ne doivent pas être utilisées à la place des données obtenues lors du dosage.

## XI. CONTRÔLE QUALITÉ

Il convient d'analyser le plasma ou les groupes de plasma du contrôle à chaque fois qu'on effectue un test d'étalons et d'échantillons de patients. Utiliser des méthodes statistiques appropriées pour évaluer si les résultats de l'analyse d'échantillons de contrôle sont acceptables. Si une ou plusieurs valeurs d'échantillon du contrôle qualité des dosages se situent en dehors des limites acceptables, il se peut que les résultats de l'échantillon de patient ne soient pas valables.

## XII. LIMITES DE LA PROCÉDURE

La trousse ACTH ELISA de Biomerica n'a montré aucun « effet crochet » avec des échantillons enrichis avec 20 000 pg/ml d'ACTH. Toutefois, il est conseillé de diluer les échantillons dont les taux d'ACTH sont supérieures à l'étalon le plus élevé et de les doser à nouveau pour obtenir des valeurs correctes.

Comme tout analyte utilisé en complément à un diagnostic, les résultats d'ACTH doivent être interprétés avec soin en association avec les présentations cliniques globales et tout autre test diagnostique de support.

Les échantillons de patients régulièrement exposés à des produits d'origine animale ou à base de sérums animaux peuvent contenir des anticorps hétérophiles, entraînant des résultats atypiques. Ce dosage a été formulé pour atténuer le risque de ce type d'interférence. Cependant, des interactions potentielles peuvent survenir entre les sérums rares et les éléments de test.

## XIII. VALEURS ATTENDUES

Les taux d'ACTH ont été mesurés chez cent trente-quatre (134) individus apparemment sains, aux États-Unis, avec le test ACTH ELISA de Biomerica. Les valeurs obtenues se situaient entre 7,0 et 63 pg/ml. Selon les tests statistiques sur l'asymétrie et l'aplatissement, la population dont les données sont exprimées sous forme de logarithmes suit la distribution normale ou courbe de Gauss. Les écarts-types géométriques  $\pm 2$  de la moyenne devraient se situer entre 6,17 et 58,2 pg/ml d'après les calculs.

## XIV. PERFORMANCES

### Précision

Trois cent (300) échantillons de patients, dont les valeurs d'ACTH allaient de 1,0 à 640 pg/ml ont été dosés selon la procédure précédente de Biomerica et la procédure ACTH de Biomerica mise à jour. L'analyse de régression linéaire donne les statistiques suivantes :

$$\text{Biomerica ELISA} = 1,02 \text{ La trousse ELISA} - 1,58 \text{ pg/ml}$$

$$r = 0,995 \quad N = 300$$

### Sensibilité

La sensibilité, soit la limite minimale de détection, de ce dosage est définie comme étant la plus petite valeur distincte de zéro à la limite de confiance de 95 %. La sensibilité du test ACTH ELISA de Biomerica est de 0,22 pg/ml selon les calculs.

### Précision et reproductibilité

La précision (variations intra-essai) du test ACTH ELISA de Biomerica a été calculée à partir de 25 dosages répétées sur chacun des deux échantillons.

#### Variation intra-essai

Échantillon	Valeur moyenne (pg/mL)	N	Coefficient de variations %
A	42,2	25	6,71
B	269,9	25	2,27

La précision totale (variation intra-essai) du test ACTH ELISA de Biomerica a été calculée à partir de données de deux échantillons, obtenues après 21 dosages effectués par trois techniciens sur trois lots différents de réactifs pendant neuf semaines.

#### Variation inter-essais

Échantillon	Valeur moyenne (pg/mL)	N	Coefficient de variations %
A	42,3	21	7,1
B	287,8	21	6,9

### Spécificité et réactivité croisée

La réactivité croisée dans l'ACTH a été étudiée en ajoutant divers éléments à une ACTH standard. Les résultats obtenus sont comme suit :

Réactif mixte	Concentration du réactif mixte	ACTH sans réactif mixte [pg/ml]	ACTH avec réactif mixte [pg/ml]	Modification de ACTH [pg/ml]	% Réactivité croisée
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-ENDORPHINE	100 000 pg/ml	73,8	60,5	-13,3	-0,01 %
	50 000 pg/ml	73,8	56,9	-16,9	-0,03 %

### Récupération

On a ajouté des volumes différents d'ACTH à quatre plasmas de patients différents pour déterminer la récupération. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Échantillon de plasma	ACTH endogène (pg/ml)	ACTH ajoutée (pg/ml)	Valeur attendue (pg/ml)	Valeur mesurée (pg/ml)	Récupération (%)
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 %

### Effet cinétique du dosage

Afin de déterminer s'il existe un effet cinétique systématique entre le début et la fin du dosage, trois groupes d'échantillons patients enrichis, sélectionnés pour représenter les valeurs significatives de la concentration en ACTH, ont été placés par ordre de la long d'une microplaque ou de 96 puits [avec 12 bandelettes de 8 puits].

### Linéarité des dilutions d'échantillons de patients : Parallélisme

Cinq échantillons de plasma de patients ont été dilués avec l'étalon A (étalon zéro). Les résultats en pg/ml sont indiqués ci-après :

Échantillon	Dilution	Attendue pg/mL	Observée pg/mL	% Observé ÷ Attendue
A	Non dilué	-	288	-
	1:2	144	150	104%
	1:4	72	70,9	98%
	1:8	36	35,7	99%
B	Non dilué	-	468	-
	1:2	234	278	119%
	1:4	117	135	115%
	1:8	58,5	65,5	112%
C	Non dilué	-	270	-
	1:2	135	146	108%
	1:4	67,5	68	101%
	1:8	33,75	33,5	99%
D	Non dilué	-	336	-
	1:2	168	149	89%
	1:4	84	83	99%
	1:8	42	47	112%
E	Non dilué	-	452	-
	1:2	226	268	119%
	1:4	113	126	112%
	1:8	56,5	68,9	122%

### XV. RÉFÉRENCES :

- 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. SYMBOLES

	Température de conservation
	Code de fournée
	Expiration
	Fabricant
	Agent agréé
	Précaution, voir des instructions
	Pour un diagnostic in vitro
	N° de catalogue

### XVII. COMMANDE DE PRODUITS

COMMANDES : Envoyer les commandes à :



BIOMERICA, INC.  
17571 Von Karman Avenue  
Irvine, California 92614  
U.S.A.

2°C / 8°C

IVD

Téléphone :

(949) 645-2111

Fax :

(949) 553-1231

Site Web :

www.biomerica.com

E-mail :

bmra@biomerica.com



conformément à la directive 98/79/ de la CE sur les dispositifs médicaux de diagnostic in vitro

MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
D-30175 Hannover  
Allemagne

67023-11\_fre.doc

janvier 2018