

Test ACTH [ormone adrenocorticotropo] ELISA [saggio immunoenzimatico]

REF 7023

Analisi quantitativa specifica per la determinazione
dell'ormone adrenocorticotropo nel plasma

gennaio 2018



I. USO PREVISTO

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

II. RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

L'ACTH (ormone adrenocorticotropo) o corticotropina è un ormone polipeptidico formato da 39 aminoacidi (MW=4500), secreto dall'ipofisi per regolare la produzione di ormoni steroidi da parte della corteccia surrenale. La secrezione di ACTH da parte dell'ipofisi anteriore è controllata sia da un meccanismo classico a feedback negativo sia da un sistema di controllo mediato dallo stress del sistema nervoso centrale¹. Vari tipi di stress o di algia percepiti a livelli più alti del cervello modulano la secrezione dell'ormone ipotalamico, che stimola il rilascio della corticotropina (CRH), un peptide di 41 aminoacidi. La CRH stimola la secrezione ipofisaria di ACTH. Il secondo peptide che modula la secrezione di ACTH è la vasopressina (AVP). La secrezione di AVP è stimolata tra l'altro dallo stress e agisce in sinergia con la CRH per aumentare la secrezione di ACTH nella circolazione portale ipofisaria. L'ACTH aumenta la sintesi e il rilascio di tutti gli steroidi surrenali, aldosterone, cortisolo e androgeni surrenali. È il modulatore principale di cortisolo, il glucocorticoide più importante nell'uomo. L'aumento di cortisolo nel sangue fa sì che il rilascio di ACTH sia inibito direttamente a livello dell'ipofisi. Attraverso lo stesso meccanismo, una diminuzione dei livelli di cortisolo comporta l'aumento dei livelli di ACTH^{2,3,4,5}.

L'ACTH biologicamente attivo deriva dalla proteolisi enzimatica di una grossa molecola precursore, la proopiomelanocortina (POMC). Questa molecola contiene le sequenze aminoacidiche dei seguenti ormoni: ACTH, Pro-ACTH, β -melanotropina, lipotropina, endorfina ed encefalina. Poiché nei saggi immunoenzimatici la reazione è determinata dalla struttura antigenica e non dalla funzione biologica, il dosaggio radioimmunologico ACTH RIA reagisce con gli ormoni POMC, Pro-ACTH, ACTH e con alcuni frammenti dell'ACTH⁵.

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

III. SIGNIFICATO CLINICO

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

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

risposta superiore al normale allo stimolo con metirapone (Metopirone) e livelli di ACTH plasmatico normali o elevati⁴.

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

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

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

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

IV. PRINCIPIO DEL TEST

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

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

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

V. COMPONENTI DEL KIT

Componenti del kit	Descrizione	Quantità
RGT 1 = Reagente 1	Anticorpo ACTH biotilinato [anti-ACTH umano di capra purificato per affinità]	1 x 2,7 mL
RGT 2 = Reagente 2	Anticorpo ACTH coniugato con perossidasi (enzima) [anti-ACTH umano monoclonale di topo]	1 x 2,7 mL
RGT A = Reagente A ELISA	Soluzione di lavaggio concentrata ELISA (fisiologica con tensioattivi)	1 x 30 mL

RGT B = Reagente B ELISA	Substrato TMB [tetrametilbenzidina]	1 x 15,5 mL
SOLN = Soluzione bloccante	Soluzione bloccante ELISA [1 N acido solforico]	1 x 20 mL
PLA = Micropiastra	Contenitore con strisce rivestite di streptavidina	12 strisce per 8 pozzetti
CAL = Calibratori A: 0 pg/mL B: C: Le concentrazioni esatte sono riportate sull'etichetta delle provette D: E: F:	h-ACTH sintetico liofilizzato (tranne calibratore zero). Calibratore zero [soluzione BSA con siero equino] in forma liquida, pronto all'uso. Tutti gli altri calibratori: h-ACTH (1-39) sintetico in soluzione BSA con siero equino.	1 x 4 mL per calibratore zero 1 x 2 mL per altri calibratori
CTRL = Controlli 1 e 2 I valori esatti sono riportati sull'etichetta delle provette	Liofilizzati. 2 livelli. h-ACTH (1-39) sintetico in soluzione BSA con siero equino	1 x 2 mL per livello

MATERIALI E STRUMENTAZIONE (NON IN DOTAZIONE)

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

Agitatori per micropiastre	Diametro di agitazione	Impostazione di velocità
Orbitale	3 mm (0,118 in)	600 ± 10 giri/minuto
	19 mm (0,75in)	170 ± 10 giri/minuto
Lineare	25 mm (0,98in)	170 ± 10 giri/minuto

VI. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

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

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

VII. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

La determinazione dell'ACTH deve essere effettuata su plasma EDTA. Per analizzare il campione in duplicato, sono necessari 400 µL di plasma EDTA. Raccogliere il sangue intero in una provetta lavanda [EDTA]. Separare tempestivamente il siero o il plasma, preferibilmente in una centrifuga refrigerata, e conservare ad una temperatura pari o inferiore a -20°C. I campioni di plasma EDTA devono essere conservati a 2 ~ 8°C per un massimo di 8 ore. I campioni di plasma EDTA congelati a -20°C sono stabili per un massimo di 4 mesi.

VIII. PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEL REAGENTE

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

1. Tutti i reagenti, tranne i calibratori non zero, i controlli e la soluzione di lavaggio concentrata, sono pronti per l'uso. Conservare tutti i reagenti a ~ 8°C.
2. Per tutti i calibratori non zero (calibratore B ~ F) e i controlli 1 e 2, ricostituire ciascuna provetta con 2 µL di acqua distillata o deionizzata e mescolare. Incubare la provetta per 10 minuti, quindi mescolare abbondantemente agitando delicatamente per inversione per completare la ricostituzione. **Dopo la ricostituzione, usare calibratori e controlli quanto prima. Dopo l'uso, congelare (-20°C) al più presto i calibratori ed i controlli rimanenti.** I campioni standard e di controllo sono stabili a -20°C per 6 settimane dopo la ricostituzione, con un massimo di 3 cicli di congelamento-scongelo, se trattati in base alle raccomandazioni riportate nella sezione "Note sulla procedura".

3. **Reagente A ELISA:** Soluzione di lavaggio concentrata: mescolare abbondantemente il contenuto della soluzione di lavaggio concentrata. In presenza di un precipitato nella soluzione di lavaggio concentrata, dovuto a conservazione a basse temperature (es. 4°C), dissolvere ponendo la provetta in un bagno ad acqua o in un forno a 37°C con agitatore. Aggiungere la soluzione di lavaggio concentrata (30 mL) a 570 mL di acqua distillata o deionizzata e mescolare. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 90 giorni se conservata a temperatura ambiente.

IX. PROCEDURA DI ANALISI

1. Distribuire nel contenitore un numero sufficiente di **strisce rivestite di streptavidina** per eseguire tutti e sei (6) i calibratori ACTH, A-F tra i CALIBRATORI di ACTH (la concentrazione esatta è indicata sull'etichetta della provetta), sieri di controllo qualità e campioni paziente. Come minimo, lasciare liberi due pozzetti come "bianchi". Fare riferimento al passo 9 per la lettura finale della micropiastra.
2. Pipettare **200 µL** di calibratori, controlli e campioni nel pozzetto previsto. **Dopo l'uso, congelare (-20°C) al più presto i calibratori ed i controlli rimanenti.**
3. Aggiungere o versare **25 µL** di reagente 1 (anticorpo biotilinato) in ciascun pozzetto contenente i calibratori, controlli e campioni.
4. Aggiungere o versare **25 µL** di reagente 2 (anticorpo marcato con enzima) nei medesimi pozzetti. Coprire le micropiastre con una pellicola di alluminio o con una vaschetta per ripararle dalla luce. Posizionarle su un **agitatore** alle impostazioni consigliate (vedere la sezione V) per **4 ore ± 30 minuti** a temperatura ambiente (22 ~ 28°C).
5. Aspirare completamente il liquido, quindi lavare/aspirare ogni pozzetto cinque (5) volte con la soluzione di lavaggio (preparata dal reagente A), mediante un lavatore automatico per micropiastre. Impostare il volume della soluzione di lavaggio in modo che in ciascun pozzetto vengano versati 0,35 mL.
6. Aggiungere o versare **150 µL** di **reagente B ELISA** (substrato TMB) in ogni pozzetto.
7. Coprire le micropiastre per ripararle dalla luce e posizionarle su un **agitatore** alle impostazioni consigliate (vedere la sezione V) per **30 ± 5 minuti** a temperatura ambiente (22 ~ 28°C).
8. Aggiungere o versare **100 µL** di soluzione bloccante in ogni pozzetto. Mescolare delicatamente.
9. Leggere l'assorbanza della soluzione nei pozzetti entro 10 minuti, usando un lettore per micropiastre impostato su **450 nm**. Prima di leggere, accertarsi che entrambi i "pozzetti del bianco", come indicato al punto 1, siano riempiti con 250 µL di acqua distillata o deionizzata. Leggere la piastra con il lettore impostato a **405 nm** contro acqua distillata o deionizzata.
Nota: la seconda lettura serve ad ampliare la validità analitica della curva di calibrazione al valore rappresentato dal calibratore con il livello massimo, pari a circa 500 pg/mL. Pertanto i campioni di pazienti con un livello ACTH > 150 pg/mL possono essere quantificati in relazione ad una curva di calibrazione, costituita dai valori compresi sino all'equivalente di concentrazione del calibratore più elevato, usando il valore 405 nm, lontano dalla lunghezza d'onda della massima assorbanza. In generale, i campioni paziente e di controllo dovrebbero essere letti usando il valore 450 nm per concentrazioni di ACTH sino a 150 pg/mL. Concentrazioni di ACTH superiori a 150 pg/mL devono essere interpolate con il valore 405 nm.
10. Utilizzando i valori di assorbanza finali ottenuti nella fase precedente, costruire una curva di calibrazione mediante interpolazione con spline cubica, a 4 parametri logistici o punto-punto per quantificare la concentrazione di ACTH.

NOTE SULLA PROCEDURA

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

X. CALCOLO DEI RISULTATI

Metodo manuale

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

Metodo automatico

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

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

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

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

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

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

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

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

XI. CONTROLLO QUALITÀ

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

XII. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

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

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

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

XIII. VALORI PREVISTI

I livelli di ACTH sono stati misurati mediante il test ACTH ELISA in cento trenta quattro (134) individui in condizioni apparentemente normali negli Stati Uniti. I valori ottenuti sono compresi tra 7,0 e 63 pg/mL. Sulla base di test statistici di asimmetria e curtosi, la popolazione, una volta trasformata a livello logaritmico, segue la distribuzione normale o gaussiana. La media geometrica e ± 2 deviazioni standard calcolate sono comprese tra 6,17 e 58,2 pg/mL.

XIV. CARATTERISTICHE DELLA PROCEDURA

Accuratezza

Sono stati esaminati trecento (300) campioni di pazienti, con valori di ACTH compresi tra 1,0 e 640 pg/mL mediante la procedura di Biomerica ELISA precedente e di Biomerica ELISA aggiornata. L'analisi di regressione lineare fornisce i seguenti dati statistici:

$$\text{Biomerica ELISA} = 1,02 \text{ ELISA Kit} - 1,58 \text{ pg/mL} \\ r = 0,995 \quad N = 300$$

Sensibilità

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

Precisione e riproducibilità

La precisione (variazione intra-saggio) del test ACTH ELISA Biomerica è stata calcolata da 25 determinazioni replicate su ciascuno dei due campioni.

Variazione intra-saggio			
Campione	Valore Medio (pg/mL)	N	Coefficiente di variazione %
A	42,2	25	6,71
B	269,9	25	2,27

La precisione totale (variazione inter-saggio) del test ACTH ELISA Biomerica è stata calcolata dai dati di due campioni ottenuti in 21 saggi diversi, da parte di tre tecnici su tre partite diverse di reagenti, in un arco di tempo di nove settimane.

Variazione inter-saggio			
Campione	Valore Medio (pg/mL)	N	Coefficiente di variazione %
A	42,3	21	7,1
B	287,8	21	6,9

Specificità e reattività incrociata

La reattività incrociata nell'ACTH è stata analizzata aggiungendo vari materiali a uno standard ACTH. Di seguito sono riportati i risultati:

Cross-reagente	Concentrazione di cross-reagente	ACTH senza cross-reagente [pg/mL]	ACTH con cross-reagente [pg/mL]	Variazione di ACTH [pg/mL]	% reattività incrociata
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-ENDORFINA	100 000 pg/ml	73,8	60,5	-13,3	-0,01 %
	50 000 pg/ml	73,8	56,9	-16,9	-0,03 %

Recupero

Per determinare il recupero, al plasma di quattro pazienti diversi sono state aggiunte varie quantità di ACTH. I risultati sono descritti nella tabella seguente:

Campione di plasma	Endogeno ACTH (pg/mL)	ACTH aggiunto (pg/mL)	Valore previsto (pg/mL)	Valore misurato (pg/mL)	Recupero (%)
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 %

Effetto cinetico dell'analisi

Al fine di determinare la presenza di un effetto cinetico sistematico tra l'inizio e la fine della seduta analitica, tre pool di campioni paziente con l'aggiunta di analita, selezionati come rappresentativi di una sezione della concentrazione di ACTH, sono stati messi in sequenza in tutta la seduta di una micropiastra o di 96 pozzetti (con dodici strisce per 8 pozzetti).

Linearità delle diluizioni del campione paziente: parallelismo





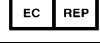



I campioni di plasma di cinque pazienti sono stati diluiti con il calibratore A (calibratore zero). I risultati, espressi in pg/mL, sono indicati di seguito:

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

XV. BIBLIOGRAFIA

- 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. SIMBOLI

	Temperatura di conservazione
	Codice di lotto
	Scadenza
	Fabbricante
	Rappresentante autorizzato
	Attenzione, vedere le istruzioni
	All'impiego diagnostico in vitro
	n. ° de Catálogo

XVII. INFORMAZIONI PER L'ORDINAZIONE

ORDINAZIONE – Inviare un ordine d'acquisto al seguente indirizzo:



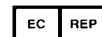
BIOMERICA, INC.
17571 Von Karman Avenue
Irvine, California 92614
U.S.A.

2°C / 8°C



Telefono: +1 949 645 2111
Fax: +1 949 553-1231
URL: www.biomerica.com
E-mail: bmra@biomerica.com





secondo IVDD 98/79/CE
MDSS GmbH
Schiffgraben 41
D-30175 Hannover
Germania

67023-11_ita.doc

gennaio 2018