



ACTH-Irma

KIP0061

Read entire protocol before use.

ACTH-IRMA

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource ACTH-IRMA Kit
- B. **Catalog number :** KIP0061: 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological Activity

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

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

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

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

B. Clinical Application

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

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

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

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIASource ACTH-IRMA is a two-step immunoradiometric assay based on coated-tube separation. It allows the determination of intact human adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in EDTA plasma. Monoclonal antibodies specific to the 1-24 ACTH fragment (N-terminal fragment) are attached to the lower and inner surface of the plastic tubes. Calibrators or samples are added to the tubes. After 2 hour incubation, washing removes the occasional excess of antigen, mid-regional and C-terminal fragments. ¹²⁵I labelled polyclonal antibodies specific to the 24-39 ACTH fragment (C-terminal fragment) are added. After 1 hour incubation and washing the remaining radioactivity bound to the tube reflects the intact ACTH concentration.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents			Quantity 96 tests	Colour Code	Reconstitution			
 Tubes coated with anti ACTH (monoclonal antibodies)			2 x 48	red	Ready for use			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table> Anti-ACTH- ¹²⁵ I (polyclonal antibodies) in Phosphate Buffer with bovine albumin and sodium azide (<0.1%)			Ab	125I	CONC	1 vial 0.8 ml 1020 kBq	red	Dilute 21x with Tracer Buffer (see section VII. C)
Ab	125I	CONC						
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Tracer Buffer: Borate Buffer with sheep serum, EDTA and azide (<0.1%)			TRACER	BUF	1 vial 11 ml	black	Ready for use	
TRACER	BUF							
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Zero Calibrator in human serum with thymol and benzamidin			CAL	0	1 vial lyophil.	yellow	Add 5 ml reconstitution solution	
CAL	0							
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrators 1-6 in human serum with thymol and benzamidin (see exact values on vial labels)			CAL	N	6 vials lyophil.	yellow	Add 1 ml reconstitution solution	
CAL	N							
<table border="1"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Reconstitution solution : Borate Buffer with EDTA and sodium azide (< 0.1%)			REC	SOLN	1 vial 15 ml	blue	Ready for use	
REC	SOLN							
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Incubation Buffer: Phosphate Buffer with bovine albumin and azide (<0.1%)			INC	BUF	1 vial 6 ml	black	Ready for use	
INC	BUF							
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash solution (Tween 20-NaCl)			WASH	SOLN	CONC	1 vial 40 ml	green	Dilute 20x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC						
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls 1 and 2 in human serum with thymol			CONTROL	N	2 vials lyophil.	silver	Add 1 ml reconstitution solution	
CONTROL	N							

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

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml and 3 ml. (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Tube shaker (400 rpm)
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system (optional).
- Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

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

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- The calibrators and controls are very unstable, use them immediately after reconstitution, freeze immediately in aliquots and keep them at -20°C for maximum 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at -20°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

X. PROCEDURE

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

17. Wash again the tubes with 2 ml Wash Solution (except total counts) and aspirate.
18. After the last washing, let the tubes standing upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
19. Count the tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

XII. TYPICAL DATA

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

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

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

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

B. Specificity

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

Added analyte to a low ACTH level EDTA plasma	Observed ACTH level (pg/ml)	Added analyte to a medium ACTH level EDTA plasma	Observed ACTH level (pg/ml)
Nothing	0.9	Nothing	34.5
ACTH 1-17 fragment 100000 pg/ml	0.8	ACTH 1-17 fragment 100000 pg/ml	25.0
ACTH 18-39 fragment100000 pg/ml	7.1	ACTH 18-39 fragment100000 pg/ml	33.5
Rat ACTH 1000 pg/ml	364.7	Rat ACTH 1000 pg/ml	450.0
αMSH 100000 pg/ml	1.8	αMSH 100000 pg/ml	31.6
βMSH 100000 pg/ml	0.9	βMSH 100000 pg/ml	33.0
βEndorphin 100000 pg/ml	1.1	βEndorphin 100000 pg/ml	32.8

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

C. Precision

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

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

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

DILUTION TEST			
Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)
1	1/1	-	499.4
	1/2	249.7	226.2
	1/4	124.8	111.0
	1/8	62.4	57.5
	1/16	31.2	27.8
	1/32	15.6	16.1
	1/64	7.8	7.1
2	1/1	-	384.4
	1/2	174.2	167.5
	1/4	87.1	89.9
	1/8	43.5	40.0
	1/16	21.8	20.6
	1/32	10.9	10.4
	1/64	5.4	5.7

Samples were diluted with zero calibrator.

E. Time Delay

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

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

F. Hook effect

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

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

XV. REFERENCE INTERVALS

The values provided below are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

The range of ACTH levels in 47 normal patients, expressed as 2.5% to 97.5% percentiles, was 9.6 to 49.7 pg/ml.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

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

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be

contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

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

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. SMITH IA, FUNDER JW.
Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.
Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.

2. LUMPKIN MD.
The regulation of ACTH secretion by IL-1.
Science 1987; 238:452-454.

3. MILLER WL.
Molecular biology of steroid hormones synthesis.
Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.

4. FRASER NL.
Storage of biological sample.
NASA Cr- 1967; 781.

5. RAFF H.
Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.

6. GOVERDE HJ.
Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson’s syndrome.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.

7. GOVERDE HJ.
The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.

8. LAMBERT A.
On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.

9. KRIEGER DT.
Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.

10. KRIEGER DT.
Physiopathology of Cushing’s disease.
Endocrine Review. 1983; 4:22-43.

11. GANONG WF.
ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.
N Engl J Med. 1974; 290-1006.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

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

DIAsource Catalogue Nr : KIP0061	P.I. Number : 1700610/en	Date of issue : 090409/1
-------------------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Revision date: 2009-04-09

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

ACTH-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

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

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource ACTH-IRMA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP0061 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CONTEXTE CLINIQUE

A Activités biologiques

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

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

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

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

B. Application clinique

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

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

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

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse DIAsource ACTH-Irma est une trousse de dosage radio-immunométrique en deux étapes basée sur la séparation en tube recouvert d'anticorps. Elle permet la détermination de l'hormone adrénocorticotrope humaine intacte (ACTH) dans le plasma prélevé sur EDTA. Des anticorps monoclonaux spécifiques du fragment 1-24 de l'ACTH (fragment N-terminal) sont fixés dans le fond et sur la surface intérieure de tubes en plastique. Les calibrateurs et les échantillons sont ajoutés aux tubes. Après 2 heures d'incubation, le lavage enlève l'excès éventuel d'antigène, les fragments médians et les fragments C-terminaux. On ajoute des anticorps polyclonaux marqués à l¹²⁵I spécifiques du fragment 24-29 de l'ACTH (fragment C-terminal). Après 1 heure d'incubation et un lavage, la radioactivité restante liée au tube reflète la concentration en ACTH intacte.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs			Trousse de 96 analyses	Code Couleur	Reconstitution
 Tubes recouverts avec l'anti ACTH (anticorps monoclonaux)			2 x 48	Rouge	Prêt à l'emploi
Ab	125I	CONC	1 flacon 0,8 ml 1020 kBq	Rouge	Diluer 21 x avec du tampon traceur (voir section VII.C).
Anti-ACTH- ¹²⁵ I (anticorps polyclonaux) dans un tampon Phosphate avec de l'albumine bovine et de l'azoture (<0.1 %)					
TRACER	BUF		1 flacon 11 ml	noir	Prêt à l'emploi
Tampon traceur: Tampon borate avec sérum de mouton, EDTA et azoture (<0.1 %)					
CAL	0		1 flacon lyophilisé	Jaune	Ajouter 5,0 ml de la solution de reconstitution
Calibrateur zéro dans du sérum humain contenant du thymol et benzamidine					
CAL	N		6 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 1,0 ml de la solution de reconstitution
Calibrateur N = 1 à 6 (cf. Valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum humain contenant du thymol et benzamidine					
REC	SOLN		1 flacon 15 ml	bleu	Prêt à l'emploi
Solution de reconstitution : Tampon borate avec EDTA et azoture de sodium (< 0.1%)					
INC	BUF		1flacon 6 ml	Noir	Prêt à l'emploi
Tampon d'incubation : tampon phosphate contenant de l'albumine bovine et de l'azoture (<0.1 %)					
WASH	SOLN	CONC	1 flacon 40 ml	Vert	Diluer 20 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
Solution de Lavage (Tween - NaCl)					
CONTROL	N		2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 1,0 ml de la solution de reconstitution
Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et du thymol					

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

VI. MATERIEL NON FOURNI

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

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

- 8. Tout compteur gamma capable de mesurer l¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

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

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

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

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

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

X. MODE OPERATOIRE

- A. **Notes de manipulation**
Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.
Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.
Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

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

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

XI. CALCUL DES RESULTATS

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

XII. DONNEES TYPES

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

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

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Sensibilité

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

B. Spécificité

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

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

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

C. Précision

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

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

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

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,1
2	1/1	-	384,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

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

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

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

F. Effet crochet

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

XIV. CONTROLE QUALITE INTERNE

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

XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont donnés à titre d' information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.
La portée des taux en ACTH chez 47 patients normaux, exprimée comme 2,5% à 97,5% percentiles, était 9,6 à 49,7 pg/ml.

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité
Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.
Cette trousse contient de I¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).
Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.
Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.
Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devra être conforme aux procédures locales de sécurité.
Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.
L'azoture de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azoture de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azoture dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.
Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. SMITH IA, FUNDER JW.
Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.
Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.

2. LUMPKIN MD.
The regulation of ACTH secretion by IL-1.
Science 1987; 238:452-454.

3. MILLER WL.
Molecular biology of steroid hormones synthesis.
Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.

4. FRASER NL.
Storage of biological sample.
NASA Cr- 1967; 781.

5. RAFF H.
Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.

6. GOVERDE HJ.
Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson's syndrome.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.

7. GOVERDE HJ.
The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.

8. LAMBERT A.
On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.

9. KRIEGER DT.
Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.

10. KRIEGER DT.
Physiopathology of Cushing's disease.
Endocrine Review. 1983; 4:22-43.

11. GANONG WF.
ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.
N Engl J Med. 1974; 290-1006.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

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

Numéro de catalogue DIASource : KIP0061	Numéro de P.I. : 1700610/fr	Numéro de révision : 090409/1
--	--------------------------------	----------------------------------

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

ACTH-IRMA

I. VERWENDUNGSZWECK

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

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource ACTH-IRMA Kit
- B. **Katalognummer :** KIP0061 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

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

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A Biologische Aktivitäten

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

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

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

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

B. Klinische Anwendung

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

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

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

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DIASource ACTH-IRMA ist ein Zwei-Schritt immunradiometrischer Assay in beschichteten Röhrchen. Es ermöglicht die Bestimmung von intaktem humanen adrenocorticotropen Hormon (ACTH) in EDTA-Plasma. Für das 1-24 ACTH- Fragment (N-terminales Fragment) spezifische monoklonale Antikörper sind an die untere innere Fläche der Plastikröhrchen gebunden. Kalibratoren oder Proben werden den Röhrchen zugefügt. Nach 2 Stunden Inkubation wird der Überschuß von Antigen, mittelregionalen und C-terminalen Fragmenten ausgewaschen. ¹²⁵I gelabelte polyklonale Antikörper, die spezifisch für das 1-24 ACTH Fragment (C-terminales Fragment) werden zugefügt. Nach 1 Stunde Inkubation und Waschen entspricht die an die Röhrchen gebundene Radioaktivität der Konzentration von intakter ACTH.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien			96 Test Kit	Farb Code	Rekonstitution			
 Mit anti ACTH-beschichtete Röhrchen (monoklonale Antikörper)			2 x 48	rot	gebrauchsfertig			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table> TRACER: ¹²⁵Iodmarkierter Anti-ACTH (polyklonale Antikörper) in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Azid (<0.1%)			Ab	125I	CONC	1 Gefäß 0,8 ml 1020 kBq	rot	21 x mit Tracerpuffer verdünnen (siehe Sektion VII C).
Ab	125I	CONC						
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Tracerpuffer: Boratpuffer mit Schafserum, EDTA und Azid (<0.1%)			TRACER	BUF	1 Gefäß 11 ml	schwarz	gebrauchsfertig	
TRACER	BUF							
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Null Kalibrator in Humanserum mit Thymol und Benzamidin			CAL	0	1 Gefäß lyophilisiert	gelb	5,0 ml Rekonstituierungslösung zugeben	
CAL	0							
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrator - N = 1 to 6 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanserum mit Thymol und Benzamidin			CAL	N	6 Gefäße lyophilisiert	gelb	1,0 ml Rekonstituierungslösung zugeben	
CAL	N							
<table border="1"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Rekonstituierungslösung: Boratpuffer mit EDTA und Natriumazid (<0,1%)			REC	SOLN	1 Gefäß 15 ml	blau	gebrauchsfertig	
REC	SOLN							
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Inkubationspuffer: Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin, und Azid (<0,1%)			INC	BUF	1 Gefäß 6 ml	schwarz	gebrauchsfertig	
INC	BUF							
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung (Tween 20 - NaCl)			WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 40 ml	grün	20 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
WASH	SOLN	CONC						
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen - N = 1 or 2 Humanserum und Thymol			CONTROL	N	2 Gefäße lyophilisiert	silber	1,0 ml Rekonstituierungslösung zugeben	
CONTROL	N							

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

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

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

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

VII. REAGENT PREPARATION

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

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Die Kalibratoren und Proben sind sehr instabil. Benutzung sofort nach der Rekonstitution oder sofort in Aliquots bei -20°C für bis zu 3 Monate einfrieren. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei -20° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

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

X. DURCHFÜHRUNG

- A. **Bemerkungen zur Durchführung**
Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum. Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
- B. **Durchführung**
 1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
 2. Vortexen Sie Kalibratoren, Proben und Kontrollen kurz und geben Sie jeweils 200 µl in ihre Röhrchen.
 3. Dispensieren sie 50 µl Inkubationspuffer in jedes Röhrchen, außer dem für die gesamtaktivität.
 4. Schütteln Sie das Rack mit den Röhrchen sanft mit der Hand, um angeheftete Luftblasen freizusetzen.
 5. Inkubieren Sie 120 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).
 6. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
 7. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
 8. Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.

9.

Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab.
10.

Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
11.

Geben Sie 100 Öl des Tracers in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
12.

Schütteln Sie das Rack mit den Röhrchen sanft mit der Hand, um angeheftete Luftblasen freizusetzen.
13.

Inkubieren Sie 60 Minuten bei Raumtemperatur unter st ndigem Schütteln (400 rpm).
14.

Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
15.

Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
16.

Saugen Sie den Inhalt jeden Röhrchens (außer Gesamtaktivität) ab.
17.

Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab.
18.

Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
19.

Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1.

Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
2.

Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration ACTH (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausre er“ aus.
3.

Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
4.

Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer “4 Parameter”-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

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

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

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen. Die Nachweisgrenze, definiert als die offensichtliche Konzentration 3 Standardabweichungen über den Counts bei Nullbindung, war 1,16 pg/ml.

B. Spezifität

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

Zugesetzter Analyt zu einem EDTA-Plasma mit niedrigem Spiegel	Beobachtete ACTH Spiegel (pg/ml)	Zugesetzter Analyt zu einem EDTA-Plasma mit mittlerem Spiegel	Beobachtete ACTH Spiegel (pg/ml)
Keine Zugabe	0,9	ACTH 1-17 Fragment100000 pg/ml	34,5
ACTH 1-17 Fragment100000 pg/ml	0,8	ACTH 18-39 Fragment100000 pg/ml	25,0
ACTH 18-39 Fragment100000 pg/ml	7,1	ACTH Ratte 1000 pg/ml	33,5
ACTH Ratte 1000 pg/ml	364,7	�MSH 100000 pg/ml	450,0
�MSH 100000 pg/ml	1,8	�MSH 100000 pg/ml	31,6
�MSH 100000 pg/ml	0,9	�MSH 100000 pg/ml	33,0
�Endorphin 100000 pg/ml	1,1	�Endorphin 100000 pg/ml	32,8

Dieses zeigt, dass der ACTH-IRMA keine Kreuzreaktionen mit  MSH,  MSH und  Endorphin ACTH- Fragmenten , aber kreuzreagiert mit Ratten-ACTH zu 39%.

C. Präzision

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

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERD�NNUNGSTEST			
Probe	Verd�nn.	Theoret. Konzent. (pg/ml)	Gemess. Konzent. (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,1
2	1/1	-	384,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

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

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

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

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

F. Hook-Effekt

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

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

XV. REFERENZINTERVALLE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.
Der Bereich der ACTH-Werte bei 47 gesunden Patienten, ausgedrückt als 2,5% bis 97,5% Perzentilen, betrug 9,6 bis 49,7 pg/ml.

XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.
Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen) , das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert.
Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.
Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.
Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.
Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.
Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.
Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.
Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

1. SMITH IA, FUNDER JW.
Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.
Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.

2. LUMPKIN MD.
The regulation of ACTH secretion by IL-1.
Science 1987; 238:452-454.

3. MILLER WL.
Molecular biology of steroid hormones synthesis.
Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.

4. FRASER NL.
Storage of biological sample.
NASA Cr- 1967; 781.

5. RAFF H.
Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.

6. GOVERDE HJ.
Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson’s syndrome.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.

7. GOVERDE HJ.
The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.

Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.

8. LAMBERT A.
On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.

9. KRIEGER DT.
Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.

10. KRIEGER DT.
Physiopathology of Cushing’s disease.
Endocrine Review. 1983; 4:22-43.

11. GANONG WF.
ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.
N Engl J Med. 1974; 290-1006.

XVIII.ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

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

DIAsource Katalognummer : KIP0061	Beipackzettelnummer: 1700610/de	Nummer der Originalausgabe: 090409/1
---	------------------------------------	--

Revisionsdatum : 2009-04-09

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

ACTH-IRMA

I. USO DEL KIT

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

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource ACTH-IRMA Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP0061: 96 test
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0) 67 88.99.99 Fax: +32 (0) 67 88.99.96

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

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

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

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

B. Applicazioni cliniche

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

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

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

IV. PRINCIPIO DEL METODO

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

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti ACTH (anticorpi monoclonali)	2 x 48	Rosso	Pronte per l'uso
Ab125I CONC Marcato: anti-ACTH (Anticorpi monoclonali) marcati con ¹²⁵I in tampone fosfato con BSA e sodio azide (<0,1%)	1 flacone 0,8ml 1020 kBq	Rosso	Diluire 21 x con tampone marcato (veda sezione XII.C)
TRACERBUF Tampone marcato: Tampone Borato con siero di pecora, EDTA e azide (<0,1%)	1 flacone 11 ml	nero	Pronto per l'uso
CAL0 Calibratore zero in siero umano, contenente timolo e benzamidina	1 flacone liofiliz.	Giallo	Aggiungere 5 ml di soluzione di ricostituzione
CALN Calibratore 1-6 (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero umano, contenente timolo e benzamidina	6 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 1,0 ml di soluzione di ricostituzione
REC SOLN Soluzione di ricostituzione: Tampone Borato con EDTA e sodio azide (<0,1%)	1 flacone 15 ml	Blu	Pronto per l'uso
INC BUF Tampone incubazione: tampone fosfato con BSA e azide (<0,1%)	1 flacone 6 ml	Nero	Pronto per l'uso
WASH SOLN CONC Tampone di lavaggio (Tween - NaCl)	1 flacone 40 ml	Verde	Diluire 20 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
CONTROLN Controlli: N = 1 o 2, in siero umano, contenente timolo	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 1,0 ml di soluzione di ricostituzione

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

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

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

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- Calibratore:** Ricostituire il calibratore zero con 5 ml di soluzione di ricostituzione e i calibratori 1-6 con 1,0 ml.
- Controlli:** Ricostituire i controlli con 1,0 ml di Soluzione di ricostituzione.
- Marcato:** preparare un adeguato volume della soluzione marcato aggiungendo 50 µl di anti-ACTH¹²⁵ ad 1 ml di Tampone marcato. Utilizzare il vortex per omogeneizzare.
- Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 19 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (20 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Calibratori e controlli sono molto instabili, utilizzarli immediatamente dopo ricostituzione, congelarli immediatamente in aliquote e mantenerli a -20°C per 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a -20°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

X. METODO DEL DOSAGGIO

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

B. Metodo del dosaggio

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

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

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

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

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

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

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

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

B. Specificità

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

Analita aggiunto a plasma EDTA con livello basso di ACTH	Livello ACTH osservato (pg/ml)	Analita aggiunto a plasma EDTA con livello medio di ACTH	Livello ACTH osservato (pg/ml)
Niente	0,9	Niente	34,5
ACTH frammento 1-17 100000 pg/ml	0,8	ACTH frammento 1-17 100000 pg/ml	25,0
ACTH frammento 18-39100000 pg/ml	7,1	ACTH frammento 18-39 100000 pg/ml	33,5
ACTH di ratto 1000 pg/ml	364,7	ACTH di ratto 1000 pg/ml	450,0
αMSH 100000 pg/ml	1,8	αMSH 100000 pg/ml	31,6
βMSH 100000 pg/ml	0,9	βMSH 100000 pg/ml	33,0
βEndorfina 100000 pg/ml	1,1	βEndorfina 100000 pg/ml	32,8

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

C. Precisione

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

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE			
Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pg/ml)	Concentrazione misurata (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,1
2	1/1	-	384,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

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

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

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

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

F. Effetto hook

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

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

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

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori vengono dati solo come guida; ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori. Il range dei livelli di ACTH in 47 pazienti normali, espresso in percentili da 2,5% a 97,5% era compreso tra 9,6 e 49,7 pg/ml.

XVI. PRECAUZIONI PER L’USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.
Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.
L’acquisto, a detenzione, l’utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.
Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all’uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.
In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l’uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.
Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E’ comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell’epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.
Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. SMITH IA, FUNDER JW.
Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.
Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.

2. LUMPKIN MD.
The regulation of ACTH secretion by IL-1.
Science 1987; 238:452-454.

3. MILLER WL.
Molecular biology of steroid hormones synthesis.
Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.

4. FRASER NL.
Storage of biological sample.
NASA Cr- 1967; 781.

5. RAFF H.
Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.

6. GOVERDE HJ.
Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson’s syndrome.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.

7. GOVERDE HJ.
The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.

8. LAMBERT A.
On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.

9. KRIEGER DT.
Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.

10. KRIEGER DT.
Physiopathology of Cushing’s disease.
Endocrine Review. 1983; 4:22-43.

11. GANONG WF.
ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.
N Engl J Med. 1974; 290-1006.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

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

Numero di catalogo di DIAsource : KIP0061	P.I. numero : 1700610/it	Revisione numero : 090409/1
--	-----------------------------	--------------------------------

Data di revisione : 2009-04-09



el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

ACTH-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

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

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

A. Εμπορική ονομασία: Κιτ ACTH-IRMA της DIASource

B. Αριθμός καταλόγου: KIP0061: 96 εξετάσεις

Γ. Κατασκευάζεται από την: DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99 Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A Βιολογικές δράσεις

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

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

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

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

B. Κλινική εφαρμογή

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

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

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

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 εξετάσεων	Χρωματικό ς κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με Αντι ACTH (μονοκλωνικά αντισώματα)	2 x 48	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
Ab 125I CONC ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: Αντι-ACTH (πολυκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με ¹²⁵Ιωδίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια ορολευκωματίνη και αζίδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 0,8 ml 1020 kBq	κόκκινο	Αραιώστε 21 x με ρυθμιστικό διάλυμα (βλ ενότητα VII. C).
TRACER BUF Ρυθμιστικό διάλυμα: διάλυμα βορικού με ορό προβάτου, EDTA και αζίδιο (<0.1%)	1 φιαλίδιο 11 ml	Μαύρο	Έτοιμο για χρήση
CAL 0 Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο ορό, θυμόλη και βενζαμιδίνη	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημ ένο	κίτρινο	Προσθέστε 5,0 ml διαλύματος ανασύστασης
CAL N Βαθμονομητής N = 1 έως 6 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό, θυμόλη και βενζαμιδίνη	6 φιαλίδια λυοφιλοποιημ ένο	κίτρινο	Προσθέστε 1,0 ml διαλύματος ανασύστασης
REC SOLN Διάλυμα ανασύστασης: διάλυμα βορικού με EDTA και αζίδιο του νατρίου(< 0.1%)	1 φιαλίδιο 15 ml	μπλε	Έτοιμο για χρήση
INC BUF Διάλυμα επώασης: Διάλυμα φωσφορικών με βόεια λευκωματίνη και αζίδιο (<0.1%)	1 φιαλίδιο 6 ml	Μαύρο	Έτοιμο για χρήση
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (Tween - NaCl)	1 φιαλίδιο 40 ml	πράσινο	Αραιώστε 20 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N Υλικά ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημ ένο	ασημί	Προσθέστε 1,0 ml διαλύματος ανασύστασης

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

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:
1. Απεσταγμένο νερό

2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 100 μl, 200 μl, 1 ml και 3 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτής στροβιλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (400rpm)
6. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
7. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
8. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απαριθμητής ακτίνων γ με δυνατότητα μέτρησης του ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

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

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου είναι πολύ ασταθείς. Χρησιμοποιήστε τους αμέσως μετά από την ανασύσταση, ψύξτε αμέσως σε κλάσματα και διατηρίστε σε -20°C για 3 μήνες.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία -20° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. **Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.
- B. **Διαδικασία**
1. Σημάνετε τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα, υλικό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των συνολικών μετρήσεων, σημάνετε 2 φυσιολογικά σωληνάρια.
2. Στροβιλίστε για λίγο βαθμονομητές, δείγματα και υλικά ελέγχου και διανείμετε 200 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
3. Διανείμετε 50 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης σε κάθε σωληνάριο, εκτός από εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ("total"). Αναδύστε τη βάση στήριξης που περιέχει τα σωληνάρια απαλά με το χέρι για να απελευθερωθούν τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα..
4.

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

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

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

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

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

B. Ειδικότητα
Πιθανά παρεμβαλλόμενα πεπτίδια προστέθηκαν σε πλάσμα EDTA χαμηλού και υψηλού επιπέδου ACTH. Μετρήθηκε η φαινομενική απόκριση ACTH.

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

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

Γ. Ακρίβεια

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

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

Δ. Ορθότητα

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

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ			
Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,1
2	1/1	-	384,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

Ε. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

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

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

ΣΤ. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)
Δείγμα EDTA πλάσματος με συγκέντρωση ACTH της τάξης των 69000 pg/ml δίνει σήμα πάνω από την υψηλότερη συγκέντρωση του βαθμονομητή.

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

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

XV. ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές παρέχονται πιο κάτω μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.
Το πεδίο τιμών των επιπέδων της ACTH σε 47 φυσιολογικούς ασθενείς, εκφρασμένο ως ποσοστό επί τοις εκατό 2,5% έως 97,5%, ήταν 9,6 έως 49,7 pg/ml.

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια
Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.
Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV). Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.
Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσότοπων. Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.
Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.
Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσωρεύσης αζιδίου.
Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και αναλώσιμα γάντια.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. SMITH IA, FUNDER JW.
Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.
Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.
2. LUMPKIN MD.
The regulation of ACTH secretion by IL-1.
Science 1987; 238:452-454.

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

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

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

Αρ. καταλόγου DIASource: KIP0061	Αριθμός P.I.: 1700610/el	Αρ. αναθεώρησης: 090409/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

ACTH-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre:** DIAsource ACTH-IRMA Kit
- B. Número de Catálogo:** KIP0061 : 96 tests
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A Actividades Biológicas

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

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

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

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

B. Aplicación clínica

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

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

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

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

DIAsource ACTH-IRMA es un ensayo inmunorradiométrico de dos pasos basado en la separación en tubos recubiertos. Permite determinar la hormona adrenocorticotropa humana (ACTH) en plasma con EDTA. Se acoplan anticuerpos monoclonales específicos para el fragmento 1-24 de la ACTH (fragmento N terminal) a la superficie inferior e interior de los tubos de plástico. A los tubos se añaden calibradores o muestras. Tras 2 horas de incubación, los lavados eliminan el posible exceso de antígeno y los fragmentos de la región media y C-terminal. Se añaden anticuerpos policlonales marcados con I¹²⁵ específicos para el fragmento 24-39 de la ACTH (fragmento C terminal). Tras 1 hora de incubación y de los lavados, la radioactividad restante unida al tubo refleja la concentración de ACTH intacta.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 test Kit	Código de Color	Reconstitución			
 Tubos recubiertos con anti ACTH (anticuerpos monoclonales)	2 x 48	rojo	Listo para uso			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table> TRAZADOR: anti-ACTH (anticuerpos polyclonales) marcado con I ¹²⁵ en tampón fosfato con albúmina bovina, y azida (<0,1%)	Ab	125I	CONC	1 vial 0,8 ml 1020 kBq	rojo	Diluir 21 x con tampón marcador (ver sección VII.C)
Ab	125I	CONC				
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Tampón marcador: Tampón de borato con suero de oveja, EDTA y azida (<0,1%)	TRACER	BUF	1 vial 11 ml	negro	Listo para uso	
TRACER	BUF					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrador cero en suero humano con thymol y benzamidina	CAL	0	1 vial liofilizado	amarillo	Añadir 5 ml de solución de reconstitución	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores N = 1 a 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero humano con thymol y benzamidina	CAL	N	6 viales liofilizados	amarillo	Añadir 1,0 ml de solución de reconstitución	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table> Solución de reconstitución: Tampón de borato con EDTA y azida sódica (< 0,1%)	REC	SOLN	1 vial 15 ml	azul	Listo para uso	
REC	SOLN					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Tampón de incubación: Tampón fosfato con albúmina bovina y azida (<0,1%)	INC	BUF	1 vial 6 ml	Negro	Listo para uso	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solución de lavado (Tween 20 - NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 40 ml	verde	Diluir 20 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 o 2 en suero humano y thymol	CONTROL	N	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 1,0 ml de solución de reconstitución	
CONTROL	N					

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

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

- Agua destilada
- Pipetas de 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml y 3 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
- Vortex
- Agitador magnético

- Agitador de tubos (400rpm)
- Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
- Sistema de aspiración (opcional)
- Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. Calibradores:**Reconstituir el calibrador cero con 5,0 ml de solución de reconstitución y los calibradores 1-6 con 1,0 ml.
- B. Controles:**Reconstituir los controles con 1,0 ml de solución de reconstitución.
- C. Marcador:** Preparar un volumen adecuado de solución marcadora añadiendo 50 µl de anti ACTH I¹²⁵ a 1 ml de tampón marcador.
- D. Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 19 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (20x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Los calibradores y controles son muy inestables, por lo que deben utilizarse inmediatamente después de la reconstitución, congelarse enseguida en partes alícuotas y mantenerse a -20° C durante 3 meses. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a -20°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

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

X. PROTOCOLO

- A. Notas de manejo**
No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.
Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.
- B. Protocolo**
- Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
 - Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 200 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
 - Dispense 50 µl de tampón de incubación en cada tubo, excepto los de los recuentos totales.
 - Agitar suavemente con la mano la gradilla que contiene los tubos para eliminar cualquier posible burbuja de aire.
 - Incubar durante 120 minutos a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
 - Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
 - Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
 - Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)

9.

Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar.
10.

Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
11.

Dispensar 100 µL del trazador en cada tubo, incluyendo los tubos correspondientes a las Cuentas Totales.
12.

Agitar suavemente con la mano la gradilla que contiene los tubos para eliminar cualquier posible burbuja de aire.
13.

Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
14.

Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
15.

Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
16.

Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales)
17.

Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar.
18.

Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
19.

Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

1.

Calcular la media de los duplicados.
2.

Representar en un gráfico semilogarítmico o linear las c.p.m. (ordenada) para cada calibrador frente a las concentraciones de ACTH (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos de calibración, rechazando los extremos claros.
3.

Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
4.

Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “ 4 parámetros”.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

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

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

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

B. Especificidad

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

Analito añadido a un plasma con EDTA y niveles bajos de ACTH		Nivel de ACTH observado (pg/ml)	Analito añadido a un plasma con EDTA y niveles medios de ACTH		Nivel de ACTH observado (pg/ml)
Nada	fragmento 1-17 de ACTH 100000 pg/ml	0,9	Nada	fragmento 1-17 de ACTH 100000 pg/ml	34,5
		0,8			25,0
ACTH de rata	α–MSH 100000 pg/ml	7,1	ACTH de rata	α–MSH 100000 pg/ml	33,5
		364,7			450,0
β–MSH	100000 pg/ml	1,8	β–MSH	100000 pg/ml	31,6
		0,9			33,0
β–endorfina	100000 pg/ml	1,1	β–endorfina	100000 pg/ml	32,8

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

C. Precisión

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

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN			
Muestra	Dilución	Concent. Teórica (pg/ml)	Concent. Medida (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,1
2	1/1	-	384,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Las muestras fueron diluidas con el calibrador cero.

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

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

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

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

F. Efecto “hook”

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

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de guía; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.
El alcance de los niveles de ACTH levels en 47 pacientes normales, expresado como percentilos de 2,5% a 97,5% fue 9,6 a 49,7 pg/ml.

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad
Para uso solo en diagnóstico in vitro.
Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35,5 keV) ionizantes.
Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.
Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.
Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.
Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.
Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.
No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. SMITH IA, FUNDER JW.
Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.
Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.

2. LUMPKIN MD.
The regulation of ACTH secretion by IL-1.
Science 1987; 238:452-454.

3. MILLER WL.
Molecular biology of steroid hormones synthesis.
Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.

4. FRASER NL.
Storage of biological sample.
NASA Cr- 1967; 781.

5. RAFF H.
Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.

6. GOVERDE HJ.
Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson’s syndrome.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.

7. GOVERDE HJ.
The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.

8. LAMBERT A.
On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.

9. KRIEGER DT.
Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.

10. KRIEGER DT.
Physiopathology of Cushing’s disease.
Endocrine Review. 1983; 4:22-43.

11. GANONG WF.
ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.
N Engl J Med. 1974; 290-1006.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

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

DIAsource Catalogo Nr : KIP0061	P.I. Numero : 1700610/es	Revisión nr : 090409/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Fecha de la revisión : 2009-04-09



Прочетете целия протокол преди употреба

ACTH-IRMA

I. УПОТРЕБА

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

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентовано име: DIAsource ACTH-IRMA Kit
- B. Каталоген номер: KIP0061: 96 теста
- C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue De l'Industrie 8 B-1400 Nivelles, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)67 88.99.99 Факс: +32 (0)67 88.99.96

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност

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

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

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

B. Клинично прилагане

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

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

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

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

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

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Кит за анализ96	Цветен код	Приготвяне
Епруветки, покрити с анти-ACTH (моноклонални антители)	2 x 48	червен	Готов за употреба
Ab ¹²⁵I CONC Анти-ACTH-¹²⁵I (поликлонални антители) във фосфатен буфер с волски серумен албумин и натриев азид (<0.1%)	1 флакон 0,8 ml 1020 kBq	червен	Разтвря се 21х с Маркиращ буфер (вж. Раздел VII. C)
TRACER BUF Маркиращ буфер: Боратен буфер с овчи серум, EDTA и азид (<0,1%)	1 флакон 11 ml	черен	Готов за употреба
CAL 0 Нулев Калибратор: в човешки серум с тимол и бендамид	1 флакон лиофилизи рани	жълт	Добавете 5 ml възстановителен разтвор
CAL N Калибратори 1-6 в човешки серум с тимол и бендамид. Виж точните стойности на етикетите на флаконите.	6 флакона лиофилизи рани	жълт	Добавете 1 ml възстановителен разтвор
REC SOLN Възстановителен разтвор: Боратен буфер с EDTA и натриев азид (< 0.1%)	1 флакон 15 ml	син	Готов за употреба
INC BUF Инкубационен буфер: Фосватен буфер с волски албумин и азид (<0,1%)	1 флакон 6 ml	черен	Готов за употреба
WASH SOLN CONC Измиващ разтвор (NaCl-Tween 20)	1 флакон 40 ml	зелен	Разредете 20х с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
CONTROL N Контроли 1 и 2 в човешки серум с тимол	2 флакона лиофилизи рани	сребърен	Добавете 1 ml Пресъздаващ разтвор (РЕКОНСТИТУИРАЩ РАЗТВОР)

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

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

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

- Дестилирана вода
- Пипети от: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml и 3 ml (препоръчва се използването на прецизни пипети с крайници за еднократна употреба).
- Завихрящ смесител
- Клатещо устройство за епруветки (400 оборота в минута)
- Магнитен сепаратор

- 5 ml автоматична спринцовка (тип Cornwall) за измиване
- Аспирационна система (по избор).
- Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ¹²⁵I (минимален капацитет от 70%)

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

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

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- Калибраторите и контролите са твърде нестабилни, използвайте ги непосредствено сред реконституирането, замразете ги веднага в аликвоти и ги съхранявайте при -20°C в продължение на 3 месеца.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Прясно приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След първата употреба, трейсера е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури -20°C.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

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

X. ПРОЦЕДУРА

- Общи бележки**
Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партии китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура. Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно разклащане или въртеливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен крайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба. Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрили точността. Съобразявайте се с времето за инкубация. Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.
- Процедура**
 - Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
 - Разбъркайте за кратко калибраторите, пробите и контролите върху вортекс и разпределете 200 µl от всеки от тях в съответните епруветки.
 - Разпределете 50 µl инкубационен буфер във всяка епруветка с изключение на тези за общи измервания.
 - Внимателно разклатете с ръка поставката с епруветките, за да освободите евентуални въздушни мехури в тях.
 - Инкубирайте за 2 часа при стайна температура в клатещо устройство за епруветки (400 оборота в минута).
 - Аспирирайте съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият

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

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

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

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

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

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

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

А. Определен лимит

Дванадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Лимитът на откриване, определен като явната концентрация три стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване е 1.16 pg/ml.

В. Специфичност

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

Добавен анализиран материал към EDTA плазма с ниско ниво на АСТН	Наблюдавано ниво на АСТН (pg/ml)	Добавен анализиран материал към EDTA плазма със средно ниво на АСТН	Наблюдавано ниво на АСТН (pg/ml)
Нищо	0,9	Нищо	34,5
АСТН 1-17 фрагмента	100000 pg/ml	АСТН 1-17 фрагмента	100000 pg/ml
АСТН 18-39 фрагмента	100000 pg/ml	АСТН 18-39 фрагмента	100000 pg/ml
АСТН от плъх	1000 pg/ml	АСТН от плъх	1000 pg/ml
αMSH	100000 pg/ml	αMSH	100000 pg/ml
βMSH	100000 pg/ml	βMSH	100000 pg/ml
β-ендорфин	100000 pg/ml	β-ендорфин	100000 pg/ml

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

С. Прецизност

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

SD : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

Д. Точност

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ			
Проба	Разреждане	Теоретична концентрация (pg/ml)	Измерена концентрация (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,1
2	1/1	-	384,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Пробите са били разредени с нулев калибратор.

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

Е. Изместване във времето

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

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

F. **Ефект на кукичката**

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

XIV. **ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ**

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

XV. **РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ**

Стойностите, показани по-долу, са предоставени само за напътствие; всяка лаборатория трябва да установи свои собствен нормален обхват на стойности.
Диапазонът от различни нива на АСТН при 47 нормални пациенти, изразени като криви на разпределение 2,5% - 97,5%, е 9,6 – 49,7 pg/ml:

XVI. **ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ**

Безопасност
Само за *in vitro* диагностика.
Този набор съдържа ¹²⁵I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35,5 keV) лъчения.
Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.
Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и съглярия, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радионуклиди.
Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.
Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените проби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност. Всички животински продукти и деривати са били събирани от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекциозни.
Избягвайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.
Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

XVII. **БИБЛИОГРАФИЯ**

1. SMITH IA, FUNDER JW.
Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.
Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.

2. LUMPKIN MD.
The regulation of ACTH secretion by IL-1.
Science 1987; 238:452-454.

3. MILLER WL.
Molecular biology of steroid hormones synthesis.
Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.

4. FRASER NL.
Storage of biological sample.
NASA Cr- 1967; 781.

5. RAFF H.
Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.

6. GOVERDE HJ.
Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson’s syndrome.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.

7. GOVERDE HJ.
The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.

8. LAMBERT A.
On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.

9. KRIEGER DT.
Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.

10. KRIEGER DT.
Physiopathology of Cushing’s disease.
Endocrine Review. 1983; 4:22-43.

11. GANONG WF.
ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.
N Engl J Med. 1974; 290-1006.

XVIII. **ОБООЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА**

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

DIAsource каталог номер: KIP0061	P.I. номер: 1700610/bu	Номер на ревизия: 090409/1
-------------------------------------	---------------------------	-------------------------------

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

ACTH-IRMA

I. PRZEZNACZENIE

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

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa firmowa: DIAsource ACTH-IRMA Kit
- B. Numer katalogowy: KIP0061: 96 oznaczeń
- C. Wyprodukowano przez: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel: +32 (0)67 88.99.99

Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

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

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

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

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

B. Zastosowania kliniczne

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

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

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

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

DIAsource ACTH-IRMA jest dwuetapowym oznaczeniem immunoradiometrycznym, opartym na separacji w opłaszczonych probówkach. Pozwala na oznaczenie nienaruszonego ludzkiego hormonu adrenokortykotropowego (ACTH) w osoczu pobranym na EDTA. Przeciwciała monoklonalne swoiste do fragmentu (N-końcowego) 1-24 ACTH są dołączone do dolnej wewnętrznej powierzchni probówek plastikowych. Do probówek są dodawane kalibratory lub próbki. Po 2 godzinach inkubacji, płukanie usuwa przypadkowy nadmiar antygenu, fragmenty środkowe i C-końcowe. Dodawane są przeciwciała poliklonalne znakowane ¹²⁵I, swoiste do fragmentu ACTH 24-39 (fragment C-końcowy). Po 1 godzinnej inkubacji i płukaniu, radioaktywność pozostałych cząstek związanych z powierzchnią probówki odzwierciedla stężenie ACTH.

V. DOSTARCZONE ODCZYNNIKI

Odczynniki	Ilość 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja
Probówki opłaszczone przeciwciałami anti-ACTH (przeciwciała monoklonalne)	2 x 48	czerwony	Gotowe do zastosowania
Ab 125I CONC Anty-ACTH-¹²⁵I (przeciwciała poliklonalne) w buforze fosforanowym z albuminą bydlęcą i azydkiem sodowym (<0,1%)	1 fiolka 0,8 ml 1020 kBq	czerwony	Rozcieńczyć 21x buforem znacznikowym (jak w rozdziale VII. C)
TRACER BUF Bufor znacznikowy: Bufor boranowy zawierający surowicę owczą, EDTA i azydek (<0,1%)	1 fiolka 11 ml	czarny	Gotowe do zastosowania
CAL 0 Kalibrator zerowy w surowicy ludzkiej zawierający tymol i benzamidynę	1 fiolka liofil.	żółty	Dodać 5 ml roztworu do rekonstytucji
CAL N Kalibratory 1-6 w surowicy ludzkiej z tymolem i benzamidyną (dokładne wartości na etykietach fiolek)	6 fiolek liofil.	żółty	Dodać 1 ml roztworu do rekonstytucji
REC SOLN Roztwór do rekonstytucji : Bufor boranowy zawierający EDTA i azydek sodowy (<0,1%)	1 fiolka 15 ml	niebieski	Gotowe do zastosowania
INC BUF Bufor do inkubacji: Bufor fosforanowy z albuminą bydlęcą i azydkiem (<0,1%)	1 fiolka 6 ml	czarny	Gotowe do zastosowania
WASH SOLN CONC Roztwór płuczący (Tween 20- NaCl)	1 fiolka 40 ml	zielony	Rozcieńczyć 20x wodą destylowaną (wykorzystać mieszkadło magnetyczne).
CONTROL N Kontrolne 1 i 2 w surowicy pochodzenia ludzkiego z tymolem	2 fiolek liofil.	srebrny	Dodać 1 ml roztworu do rekonstytucji

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

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

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

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

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

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

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

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykietach, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Kalibratory i kontrolne są bardzo nietrwałe, należy je wykorzystać zaraz po rozpuszczeniu lub od razu zamrozić w niewielkich objętościach, przechowując w temperaturze –20°C do maksymalnie 3 miesięcy. Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiołce w temperaturze od -20°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

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

X. PROCEDURA

- A. **Uwagi dotyczące obsługi**
Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności. Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.
Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste, jednorazowe końcówki pipet.
Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji.
Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

- B. **Procedura**
1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone probówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 standardowe probówki.
2. Krótko wirować kalibratory, próbki kontrolne i badane, a następnie dozować po 200 µl każdej substancji do odpowiednich probówek.
3. Dozować 50 µl buforu do inkubacji do każdej probówki, z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania.
4. Delikatnie potrząsać (ręcznie) stojak z probówkami, aby uwolnić wszelkie uwięzione pęcherzyki powietrza.
5. **Inkubować** przez 2 godziny w temperaturze pokojowej w wytrząsarce probówek (400 obrotów na minutę).
6. Aspirować zawartość każdej probówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania). Upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki, aby usunąć cały płyn.

7.

Plukać próbówki 2 ml roztworu do płukania (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). W trakcie dodawania roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
8.

Aspirować zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania).
9.

Plukać ponownie próbówki 2 ml roztworu do płukania (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania).
10.

Po ostatnim płukaniu, pozostawić próbówki odwrócone przez 2 minuty, a następnie aspirować pozostałe krople płynu.
11.

Dozować 100 µl znacznika anty- $\text{ACTH-}^{125}\text{I}$ do każdej próbówki, w tym również do nieopłaszczonych próbek do całkowitego zliczania.
12.

Delikatnie **potrząsać** (ręcznie) stojak z próbkami, aby uwolnić wszelkie uwięzione pęcherzyki powietrza.
13.

Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w wytrząsarce próbek (400 obrotów na minutę).
14.

Aspirować zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). Upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki, aby usunąć cały płyn.
15.

Plukać próbówki 2 ml roztworu do płukania (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania). W trakcie dodawania roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
16.

Aspirować zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania).
17.

Plukać ponownie próbówki 2 ml roztworu do płukania (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania).
18.

Po ostatnim płukaniu pozostawić próbówki odwrócone przez 2 minuty, a następnie aspirować pozostałe krople płynu.
19.

Zliczać próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1.

Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
2.

Na papierze milimetrowym lub w kratkę wykreślić c.p.m. (rzędna) dla każdego kalibratora wobec odpowiadającego stężenia CT (odcietą) oraz wykreślić krzywą kalibracji przez punkty kalibratora, odrzucając oczywiste wartości odbiegające od linii środkowej.
3.

Odczytać stężenie dla każdej kontroli i próbki przez naniesienie na krzywą kalibracyjną.
4.

Redukcja danych przy pomocy komputera pozwoli uprościć te obliczenia. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

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

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

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

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

B. Swoistość

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

Analit dodany do osocza EDTA zawierającego ACTH w niskim stężeniu	Obserwowany poziom ACTH (pg/ml)	Analit dodany do osocza EDTA zawierającego ACTH w średnim stężeniu	Obserwowany poziom ACTH (pg/ml)
Nic	0,9	Nic	34,5
fragment 1-17 ACTH 100000 pg/ml	0,8	fragment 1-17 ACTH 100000 pg/ml	25,0
fragment 18-39 ACTH 100000 pg/ml	7,1	fragment 18-39 ACTH100000 ng/ml	33,5
Szczurzy ACTH 1000 pg/ml	364,7	Szczurzy ACTH 1000 pg/ml	450,0
α MSH 100000 pg/ml	1,8	α MSH 100000 pg/ml	31,6
β MSH 100000 pg/ml	0,9	β MSH 100000 pg/ml	33,0
β Endorfina 100000 pg/ml	1,1	β Endorfina 100000 pg/ml	32,8

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

C. Precyzja

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

SD Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

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

BADANIE ROZCIEŃCZENIA			
Próbka	Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (pg/ml)	Stęż. zmierzone (pg/ml)
1	1/1	-	499,4
	1/2	249,7	226,2
	1/4	124,8	111,0
	1/8	62,4	57,5
	1/16	31,2	27,8
	1/32	15,6	16,1
	1/64	7,8	7,1
2	1/1	-	384,4
	1/2	174,2	167,5
	1/4	87,1	89,9
	1/8	43,5	40,0
	1/16	21,8	20,6
	1/32	10,9	10,4
	1/64	5,4	5,7

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy kalibratora zerowego.

E. Opóźnienie czasowe

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

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

F. Efekt hook'a

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

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

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

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych, każde laboratorium powinno opracować własne wartości referencyjne.

Zakres poziomów ACTH u 47 zdrowych pacjentów, wyrażonych jako grupa od 2,5% do 97,5% percentyla, wynosił od 9,6 do 49,7 pg/ml-

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*. Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35.5 keV). Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom. Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów. Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie. Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa. Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne. Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków. Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVI. BIBLIOGRAFIA

1. SMITH IA, FUNDER JW.
Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system and peripheral tissues.
Endocrin Rev. 1988; 9:159-179.

2. LUMPKIN MD.
The regulation of ACTH secretion by IL-1.
Science 1987; 238:452-454.

3. MILLER WL.
Molecular biology of steroid hormones synthesis.
Endocrin Rev. 1988; 9:295-318.

4. FRASER NL.
Storage of biological sample.
NASA Cr- 1967; 781.

5. RAFF H.
Intraoperative measurement of adrenocorticotropin (ACTH) during removal of ACTH-secreting bronchial carcinoid tumors.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1995; 80:1036-1039.

6. GOVERDE HJ.
Multiple forms of bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in human pituitary and blood of patients with Nelson’s syndrome.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993; 77:443-447.

7. GOVERDE HJ.
The bioactivity of immunoreactive adrenocorticotropin in human blood is dependent on the secretory state of the pituitary gland.
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1989; 31:255-265.

8. LAMBERT A.
On the stability in vitro of bioactive human adrenocorticotropin in blood and plasma.
Clin. Endocrinol. (Oxf) 1985; 23:253-261.

9. KRIEGER DT.
Human plasma immunoreactive lipotropin and adrenocorticotropin in normal subjects and in patients with pituitary-adrenal disease.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 1979; 48:566-571.

10. KRIEGER DT.
Physiopathology of Cushing’s disease.
Endocrine Review. 1983; 4:22-43.

11. GANONG WF.
ACTH and the regulation of adrenocortisol secretion.
N Engl J Med. 1974; 290-1006.

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

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

Nr katalogowy DIAsource: KIP0061	Numer P.I.: 1700610/pl	Nr aktualizacji: 090409/1
-------------------------------------	---------------------------	------------------------------

	<u>Used symbols</u>	<u>Symboles utilisés</u>
	Consult instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation
	Storage temperature	Température de conservation
	Use by	Utiliser jusque
	Batch code	Numéro de lot
	Catalogue number	Référence de catalogue
	Control	Contrôle
	In vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Manufacturer	Fabricant
	Contains sufficient for <n> tests	Contenu suffisant pour <n> tests
	Wash solution concentrated	Solution de lavage concentrée
	Zero calibrator	Calibrateur zéro
	Calibrator #	Calibrateur #
	Control #	Contrôle #
	Tracer	Traceur
	Tracer	Traceur
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tubes	Tubes
	Incubation buffer	Tampon d'incubation
	Acetonitrile	Acétonitrile
	Serum	Sérum
	Specimen diluent	Diluant du spécimen
	Dilution buffer	Tampon de dilution
	Antiserum	Antisérum
	Immunoabsorbent	Immunoabsorbant
	Calibrator diluent	Diluant de calibrateur
	Reconstitution solution	Solution de reconstitution
	Polyethylene glycol	Glycol Polyéthylène
	Extraction solution	Solution d'extraction
	Elution solution	Solution d'élution
	Bond Elut Silica cartridges	Cartouches Bond Elut Silica
	Pre-treatment solution	Solution de pré-traitement
	Neutralization solution	Solution de neutralisation
	Tracer buffer	Tampon traceur
	Microtiterplate	Microplaque de titration
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	Conjugate buffer	Tampon conjugué
	Chromogenic TMB concentrate	Chromogène TMB concentré
	Chromogenic TMB solution	Solution chromogène TMB
	Substrate buffer	Tampon substrat
	Stop solution	Solution d'arrêt
	Incubation serum	Sérum d'incubation
	Buffer	Tampon
	AP Conjugate	AP Conjugué
	Substrate PNPP	Tampon PNPP
	Biotin conjugate concentrate	Biotine conjugué concentré
	Avidine HRP concentrate	Avidine HRP concentré
	Assay buffer	Tampon de test
	Biotin conjugate	Biotine conjugué
	Specific Antibody	Anticorps spécifique
	Streptavidin HRP concentrate	Concentré streptavidine HRP
	Non-specific binding	Liant non spécifique
	2nd Antibody	Second anticorps
	Acidification Buffer	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Gebrauchsanweisung beachten
	Bewaartemperatuur	Lagern bei
	Houdbaar tot	Verwendbar bis
	Lotnummer	Chargenbezeichnung
	Catalogusnummer	Bestellnummer
	Controle	Kontrolle
	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek	In Vitro Diagnostikum
	Fabrikant	Hersteller
	Inhoud voldoende voor <n> testen	Ausreichend für <n> Ansätze
	Wasoplossing, geconcentreerd	Waschlösung-Konzentrat
	Nulkalibrator	Null kalibrator
	Kalibrator #	Kalibrator #
	Controle #	Kontrolle #
	Tracer	Tracer
	Tracer	Tracer
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Buisjes	Röhrchen
	Incubatiebuffer	Inkubationspuffer
	Acetonitrile	Azetonitril
	Serum	Humanserum
	Specimen diluent	Probenverdünner
	Verdunningsbuffer	Verdünnungspuffer
	Antiserum	Antiserum
	Immunoabsorbent	Immunadsorbens
	Kalibratorverdunner	Kalibratorverdünnung
	Reconstitutieoplossing	Rekonstitutionslösung
	Polyethyleen glycol	Polyethylenglykol
	Extractieoplossing	Extraktionslösung
	Elutieoplossing	Eluierungslösung
	Bond Elut Silica kolom	Bond Elut Silikakartuschen
	Pre-behandelingsoplossing	Vorbehandlungslösung
	Neutralisatieoplossing	Neutralisierungslösung
	Tracerbuffer	Tracer-Puffer
	Microtiterplaat	Mikrotiterplatte
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	Conjuaat buffer	Konjugatpuffer
	Chromogene TMB geconcentreerd	Chromogenes TMB Konzentrat
	Chromogene Oplossing TMB	Farblösung TMB
	Substraatbuffer	Substratpuffer
	Stopoplossing	Stopplösung
	Incubatieserum	Inkubationsserum
	Buffer	Puffer
	AP Conjuaat	AP Konjugat
	Substraat PNPP	Substrat PNPP
	Geconcentreerd Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuaat	Avidin-HRP-Konzentrat
	Assay buffer	Assaypuffer
	Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat
	Specifiek antilichaam	Spezifischer Antikörper
	Streptavidine-HRP concentraat	HRP Streptavidinkonzentrat
	Aspecifieke binding	Unspezifische Bindung
	2de antilichaam	Sekundärer Antikörper
	Verzuringbuffer	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso	Consultar las instrucciones de uso
	Limitazioni di temperatura	Limitación de temperatura
	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Numero di lotto	Código de lote
	Numero di catalogo	Número de catálogo
	Controllo	Control
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabbricante	Fabricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Tampone di lavaggio concentrato	Solución de lavado concentrada
	Calibratore zero	Calibrador cero
	Standard #	Calibrador #
	Controllo #	Control #
	Marcato	Trazador
	Marcato	Trazador
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Provette	Tubos
	Tampone incubazione	Tampón de incubación
	Acetonitrile	Acetonitrilo
	Siero	Suero
	Diluente campione	Diluyente de Muestra
	Tampone diluizione	Tampón de dilución
	Antisiero	Antisuero
	Immunoassorbente	Inmunoadsorbente
	Diluente calibratore	Diluyente de calibrador
	Soluzione di ricostituzione	Solución de Reconstitución
	Polietilenglicole	Glicol Polietileno
	Soluzione di estrazione	Solución de extracción
	Soluzione di eluizione	Solución de elución
	Cartucce di silice bond elut	Cartuchos Bond Elut Silica
	Soluzione di pretrattamento	Solución de Pre-tratamiento
	Soluzione di neutralizzazione	Solución de Neutralización
	Tracer Buffer	Tampón de trazador
	Piastra di microtitolazione	Placa de microvaloración
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	Buffer coniugato	Tampón de Conjugado
	Cromogena TMB concentrato	Cromógena TMB concentrada
	Soluzione cromogena TMB	Solución Cromógena TMB
	Tampone substrato	Tampón de sustrato
	Soluzione di arresto	Solución de Parada
	Incubazione con siero	Suero de Incubación
	Buffer	Tampón
	AP Coniugato	AP Conjugado
	Substrato PNPP	Sustrato PNPP
	Concentrato coniugato con biotina	Concentrado de conjugado de biotina
	Concentrato avidina HRP	Concentrado avidina-HRP
	Soluzione tampone per test	Tampón de ensayo
	Coniugato con biotina	Conjugado de biotina
	Anticorpo Specifico	Anticuerpo específico
	Streptavidina-HRP concentrata	Estreptavidina-HRP Concentrado
	Legame non-specifico	Unión no específica
	2° Anticorpo	Segundo anticuerpo
	Tampone Acidificante	Tampón de Acidificación

	<u>Símbolos utilizados</u>	<u>Använda symboler</u>
	Consulte instruções de utilização	Läs instruktionerna före användning
	Temperatura de conservação	Förvaringstemperatur
	Utilizar antes de	Används av
	Código de lote	Lotnummer
	Número de catálogo	Katalognummer
	Controlo	Kontroll
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	In vitro diagnostiskt kit
	Fabricante	Tillverkare
	Conteúdo suficiente para <n> testes	Innehållet räcker till <n> prover
	Solução de lavagem concentrada	Tvättlösning, koncentrerad
	Calibrador zero	Nollkalibrerare
	Calibrador #	Kalibrator #
	Controlo #	Kontroll #
	Marcador	Radioisotop, antigen
	Marcador	Radioisotop, antikropp
	Marcador concentrada	Radioisotop, antigen koncentrerad
	Marcador concentrada	Radioisotop, antikropp koncentrerad
	Tubos	Rör
	Tampão de incubação	Inkuberingsbuffert
	Acetonitrilo	Acetonitril
	Soro	Serum
	Diluidor de espécimes	Spädningsbuffert för prover
	Tampão de diluição	Spädningsbuffert
	Anti-soro	Antiserum
	Imunoadsorvente	Immunoadsorberare
	Diluyente do calibrador	Kalibratordiluent
	Solução de Reconstituição	Rekonstitutionslösning
	Polietileno-glicol	Polyetylglykol
	Solução de Extracção	Extraktionslösning
	Solução de Eluição	Elueringslösning
	Cartuchos de sílica Bond Elut	Silikonpatroner för elueringsbindning
	Solução de pré-tratamento	Förbehandlingslösning
	Solução de neutralização	Neutraliseringslösning
	Tampão Marcador	Tracerbuffert
	Placa de micro titulação	Microtiterplatta
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	Conjuge o tampão	Konjugatbuffert
	Cromogénica TMB concentrada	Kromogeniskt TMB-koncentrat
	Solução Cromogénica TMB	Kromogenisk TMB-lösning
	Tampão de substrato	Substratbuffert
	Solução de Paragem	Stopplösning
	Soro de incubação	Inkubationsserum
	Tampão	Buffert
	AP Conjugação	AP-konjugat
	Substrato PNPP	Substrat-PNPP
	Concentrado conjugado de biotina	Biotinkonjugat koncentrat
	Concentrado HRP de avidina	Avidin HRP-koncentrat
	Tampão de ensaio	Provbuffert
	Conjugado de biotina	Biotinkonjugat
	Anticorpo específico	-
	Estreptavidina HRP concentrado	-
	Ligações não específicas	-
	Anticorpo secundário	-
	Tampão de acidificação	-

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>	<u>Anvendte symboler</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Læs brugsvejledningen
	Θερμοκρασία αποθήκευσης	Opbevaringstemperatur
	Ημερομηνία λήξης	Anvend inden
	Αριθμός παρτίδας	Batchkode
	Αριθμός καταλόγου	Katalognummer
	Πρότυπο ελέγχου	Kontrol
	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
	Κατασκευαστής	Fabrikant
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις	Indeholder nok til <n> test
	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης	Koncentreret vaskeopløsning
	Μηδενικός βαθμονομητής	Nul-kalibrator
	Βαθμονομητής #	Kalibrator nr.
	Ορός ελέγχου #	Kontrol nr.
	Ιχνηθέτης	Markør
	Ιχνηθέτης	Markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Σωληνάρια	Tuber
	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	Inkubationsbuffer
	Ακετονιτρίλιο	Acetonitril
	Ορός	Serum
	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων	Prøvediluent
	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	Fortyndingsbuffer
	Αντιορός	Antiserum
	Ανοσοπροσροφητικό	Immonoadsorbent
	Αραιωτικό βαθμονομητών	Kalibratordiluent
	Διάλυμα ανασύστασης	Rekonstitueringsopløsning
	Πολυαιθυλενογλυκόλη	Polyetylglykol
	Διάλυμα εκχύλισης	Ekstraktionsopløsning
	Διάλυμα έκλουσης	Elueringsopløsning
	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut	Patroner med bindingselueringssilica
	Διάλυμα προεπεξεργασίας	Forbehandlingsopløsning
	Διάλυμα εξουδετέρωσης	Neutraliseringsopløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Markørbuffer
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης	Mikrotiterplade
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	Konjugatbuffer
	Χρωμογόνος TMB	Kromogen TMB-koncentreret
	Διάλυμα χρωμογόνου TMB	Kromogen TMB-opløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος	Substratbuffer
	Ανασχετικό αντιδραστήριο	Stopopløsning
	Ορός επώασης	Inkubationsserum
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Buffer
	AP Σύζευγμα	AP-konjugat
	PNPP υποστρώματος	Substrat PNPP
	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat koncentrat
	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP	Avidin HRP koncentrat
	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	Prøvebuffer
	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat
	Ειδικό Αντίσωμα	-
	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP	-
	μη-ειδική δέσμευση	-
	2ο Αντίσωμα	-
	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο	-

	<u>Stosowane symbole</u>	<u>Használt szimbólumok</u>
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją	Olvassa el a használati útmutatót
	Temperatura przechowywania	Tárolási hőmérséklet
	Zużyć przed	Lejáratí idő
	Kod serii	Gyártási kód
	Numer katalogowy	Katalógus szám
	Kontrola	Kontrol
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	In vitro diagnosztikai eszköz
	Producent	Gyártó
	Zawartość wystarczająca do <n> testów	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
	Roztwór płuczący stężony	Mosó folyadék koncentrátum
	Kalibrator zerowy	Zero kalibrátor
	Kalibrator nr	Kalibrátor #
	Kontrola nr	Kontrol #
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Probówki	Csővek
	Wymagana inkubacja buforu	Inkubáló puffer
	Acetonitryl	Acetonitril
	Surowica	Szérum
	Rozcieńczalnik próbki	Mintahígító
	Bufor do rozcieńczania	Hígító puffer
	Antysurowica	Antiszérum
	Immunoabsorbent	Immunadszorbens
	Rozcieńczalnik kalibratora	Kalibrátor hígító
	Roztwór do rozcieńczania	Mintaelőkészítő oldat
	Glikol poli(oksy)etylenowy	Polietilén glikol
	Roztwór ekstrakcyjny	Extrakciós oldat
	Roztwór elucyjny	Eluáló oldat
	Kolumny krzemionkowe Bond Elut	Bond Elut Silica szilikagél patronok
	Roztwór do przygotowania wstępnego	Előkezelő oldat
	Roztwór neutralizujący	Semlegesítő oldat
	Bufor znacznika	Nyomjelző izotóp hígító puffer
	mikropłytki	Mikrotiter lemez
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Bufor do koniugacji	Konjugátum puffer
	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB koncentrátum
	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB oldat
	Bufor substratu	Szubsztrát puffer
	Roztwór zatrzymujący reakcję	Stop oldat
	Wymagana inkubacja surowicy	Inkubációs szérum
	Bufor	Puffer
	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)	AP konjugátum
	p-nitrofenylofosforan substratowy	Szubsztrát PNPP
	Koncentrat koniugatu biotyny	Biotin konjugátum koncentrátum
	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną	Avidin HRP koncentrátum
	Bufor do oznaczania	Vizsgálati puffer
	Koniugatu biotyny	Biotin konjugátum
	Przeciwciało swoiste	Specifikus ellenanyag
	Koncentrat streptawidyny HRP	Sztreptawidin HRP koncentrátum
	Wiązanie nieswoiste	Nem-specifikus kötődés
	Drugie przeciwciało	Másodlagos ellenanyag
	Bufor zakwaszający	Savas puffer

	<u>Използвани символи</u>
	Вижте инструкцията за работа
	Температура на съхранение
	Използвайте с
LOT	Партиден код
REF	Каталожен номер
CONTROL	Контрол
IVD	Ин витро диагностично медицинско изделие
	Производител
	Съдържание достатъчно за <n> теста
WASH SOLN CONC	Концентриран измиващ разтвор
CAL 0	Нулев калибратор
CAL N	Калибратор #
CONTROL N	Контрол #
Ag 125I	Трейсър
Ab 125I	Трейсър
Ag 125I CONC	Концентриран маркер
Ab 125I CONC	Концентриран маркер
	Епруветки
INC BUF	Инкубационен буфер
ACETONITRILE	Ацетонитрил
SERUM	Серум
DIL SPE	Разредител за пробите
DIL BUF	Буфер за разреждане
ANTISERUM	Антисерум
IMMUNOABSORBENT	Имуноабсорбент
DIL CAL	Разредител за калибратора
REC SOLN	Пресъздаващ разтвор
PEG	Полиетилен гликол
EXTR SOLN	Екстрактов разтвор
ELU SOLN	Разтвор за елюиране
GEL	Силикагелни пълнители
PRE SOLN	Пред-лечебен разтвор
NEUTR SOLN	Неутрализиращ разтвор
TRACEUR BUF	Маркерен буфер
	Микротитърна пластина
Ab HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ag HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ab HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
Ag HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
CONJ BUF	Буфер за конюгата
CHROM TMB CONC	Хромогенен ТМВ концентрат
CHROM TMB	Хромогенен ТМВ разтвор
SUB BUF	Субстратен буфер
STOP SOLN	Стоп разтвор
INC SER	Инкубационен серум
BUF	Буфер
Ab AP	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза
SUB PNPP	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат
BIOT CONJ CONC	Биотин конюгиран концентрат
AVID HRP CONC	Авидин HRP концентрат
ASS BUF	Буфер за пробите
Ab BIOT	Биотин конюгат
Ab	специфично антитяло
SAV HRP CONC	стрептавидин HRP концентрат
NSB	не специфично свързване
2nd Ab	второ антитяло
ACID BUF	киселинизиращ буфер