

2° Convegno ELAS Sud Italia

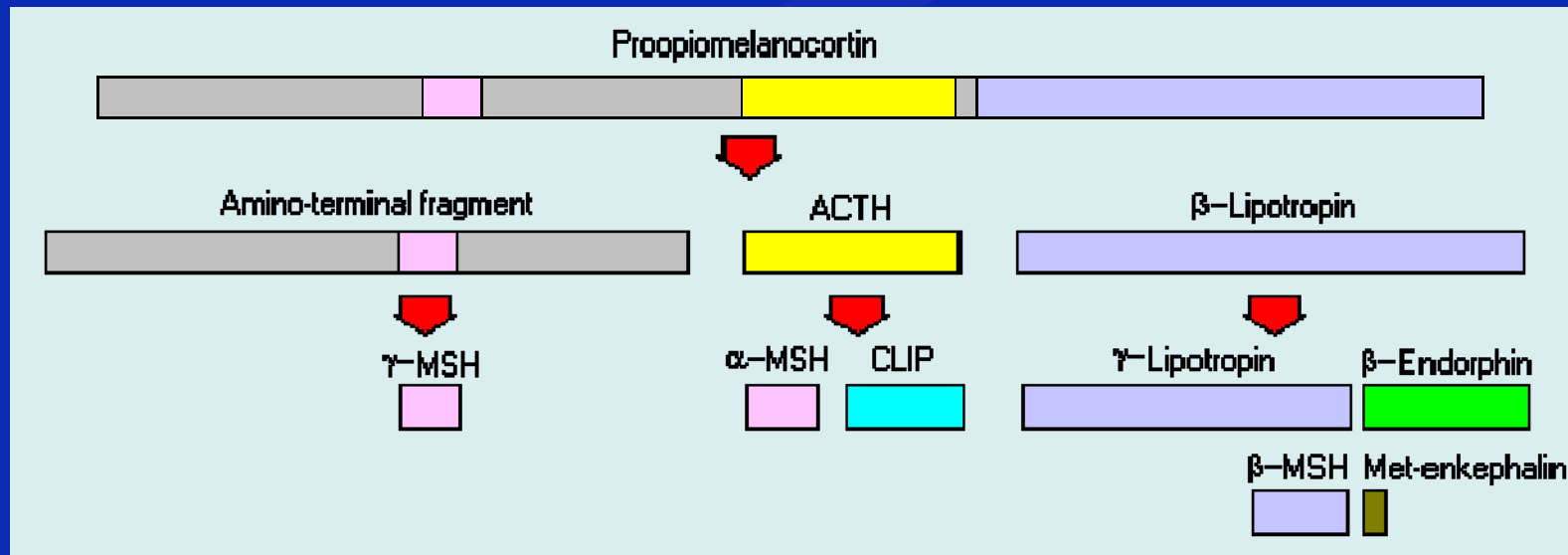
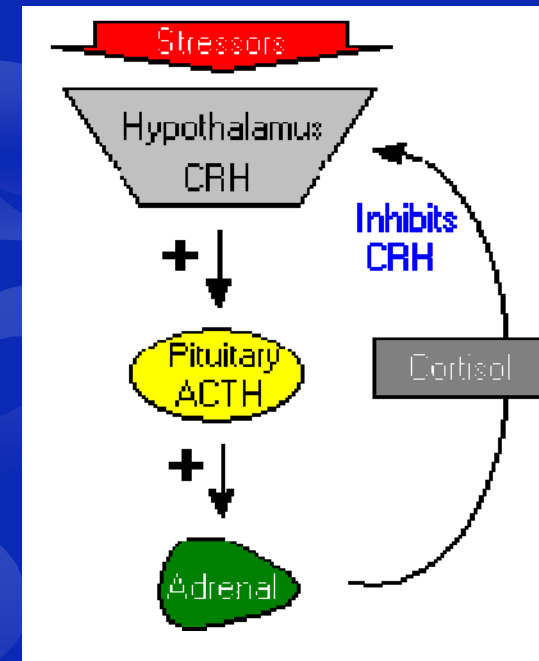
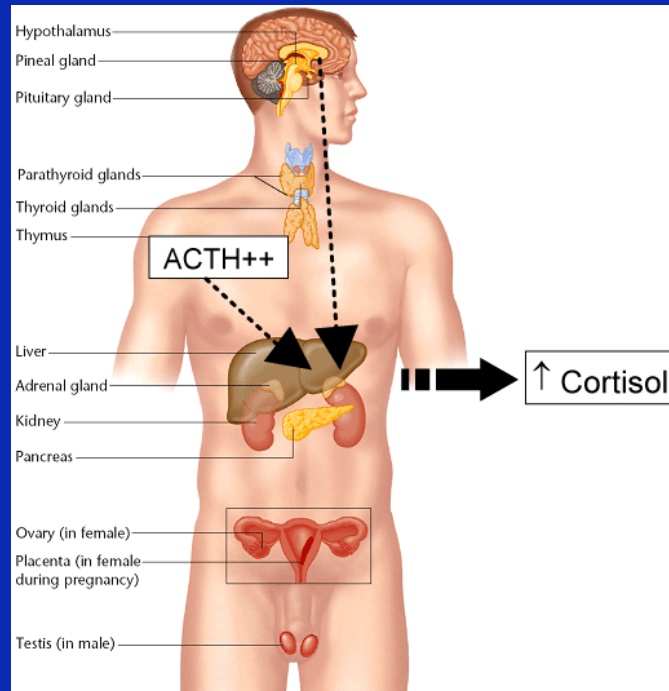
Marcatori della Malattia Diabetica, Funzionalità del Corticosurrene, Patologia Ipofisaria

Bari 26 Marzo 2010

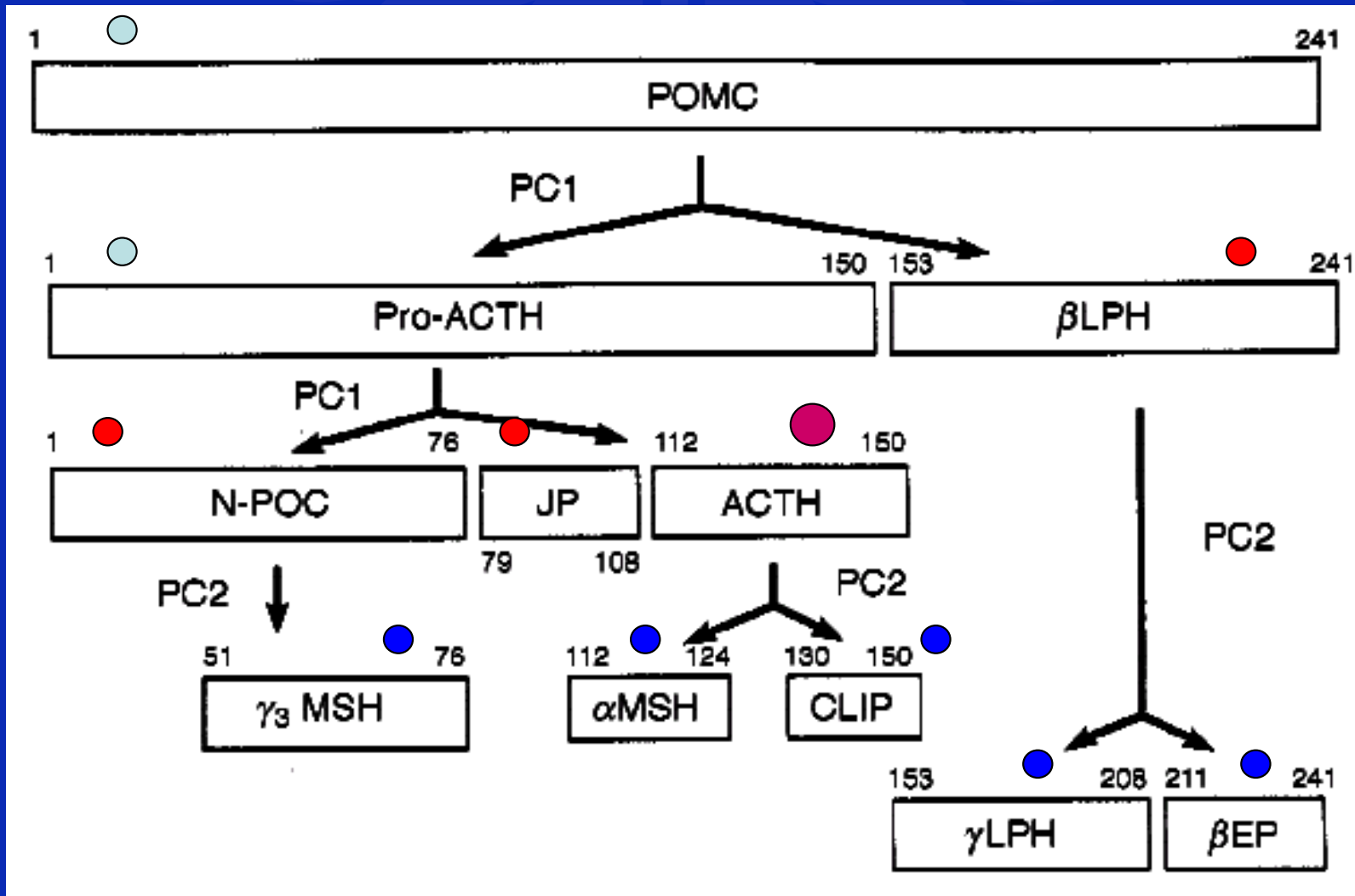
L'ACTH nella diagnostica di Laboratorio del Corticosurrene

Emiliano Aroasio, Sc.D., Ph.D.

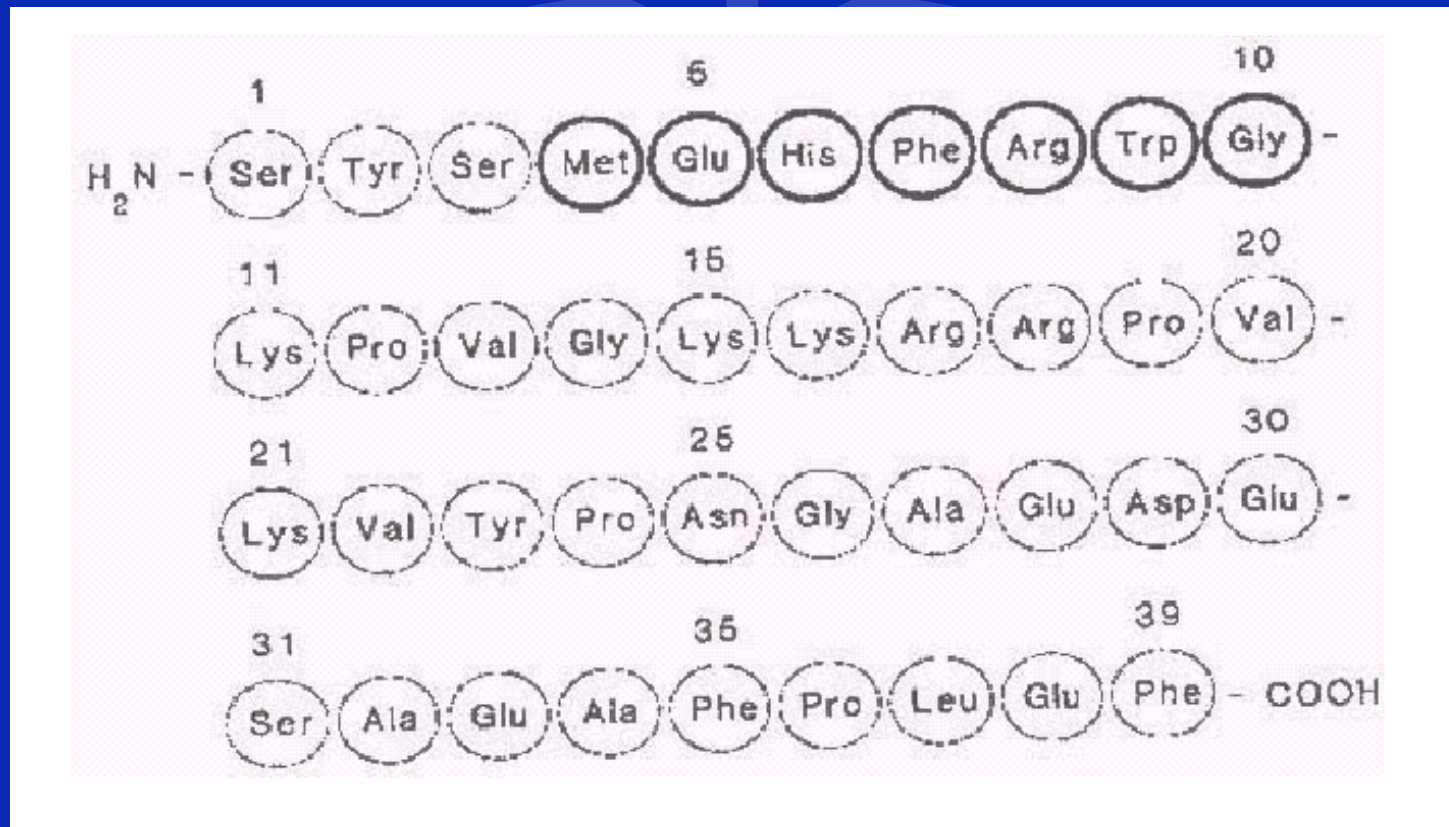




Struttura e nomenclatura dell'ACTH e dei peptidi correlati



ACTH



- L'ACTH è un polipeptide monomero di 39 aa (PM: 4541 Da)
- La regione N-terminale (1-18) è quella dotata di attività biologica
- La regione C-terminale (19-39) influenza la MCR
- L'emivita in circolo varia da 4 a 14 minuti (a seconda del metodo)

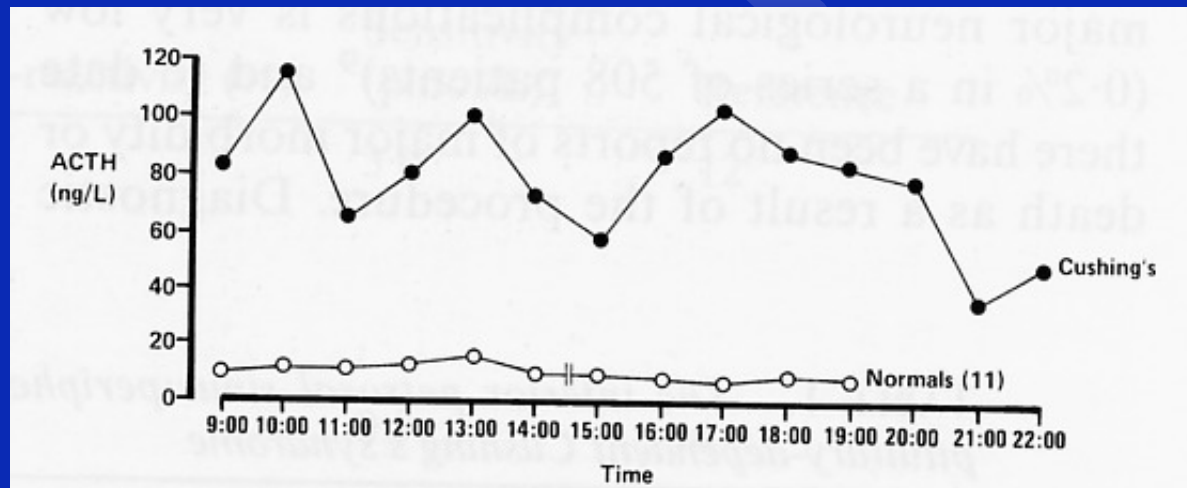


Secrezione pulsatile + Ritmo circadiano → Le diagnosi basate su una singola misura di ACTH possono risultare ingannevoli

	8 h	18 h
Médiane	17,9	14,6
Intervalle confiance 95 %	6,4-49,8	9,5-21,1

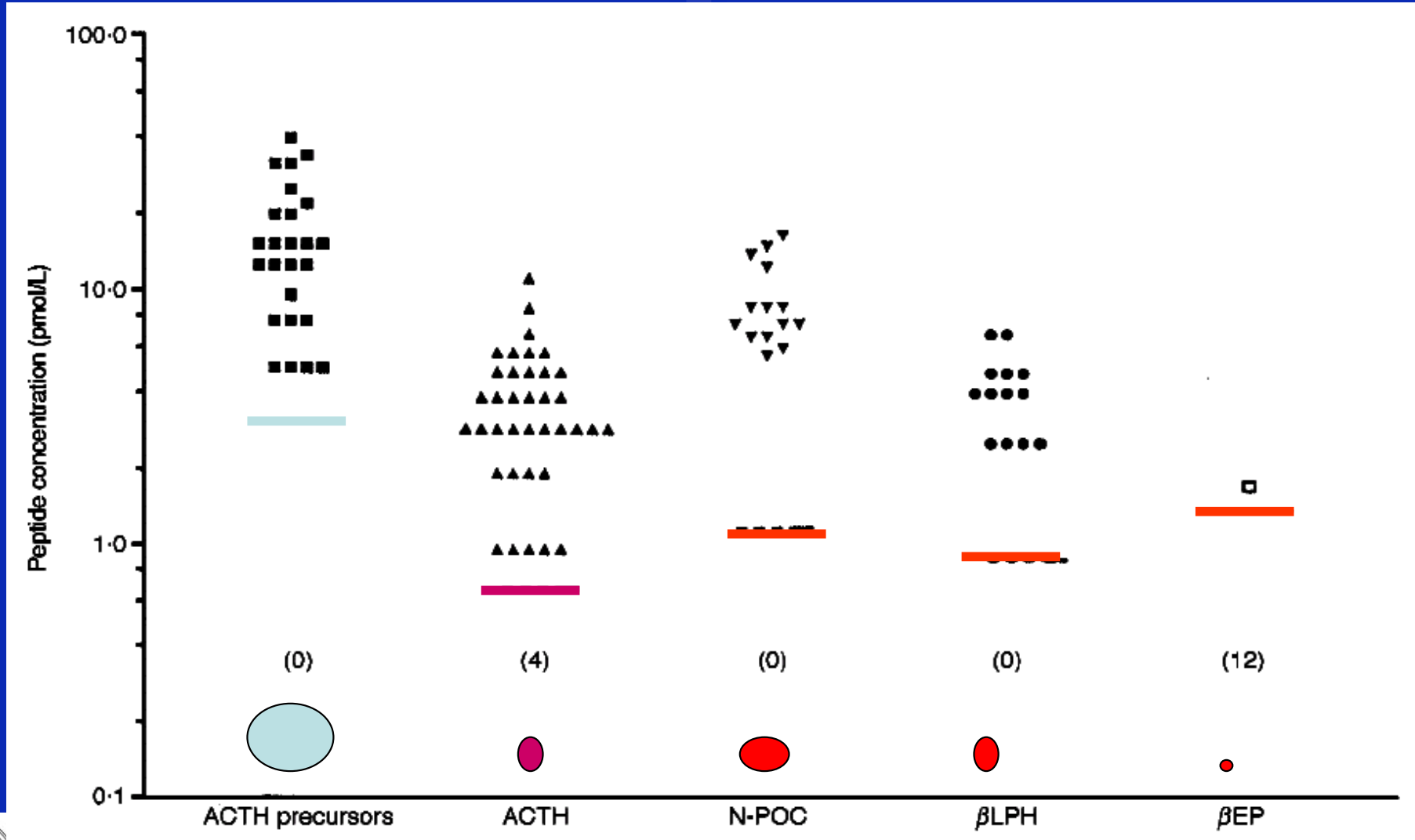
- Valori massimi fra le 6:00 e le 8:00 del mattino
- Frequenza media dei picchi: 18/24h (maschi), 10/24h (femmine)
- Ampiezza media del picco: 16.8 pg/mL (maschi), 10.3 (femmine)

Talune patologie (es. Cushing) alterano il ritmo circadiano



ACTH e peptidi correlati

Soggetti normali (h 9:30)



Saggi immunometrici per la misura dell'ACTH



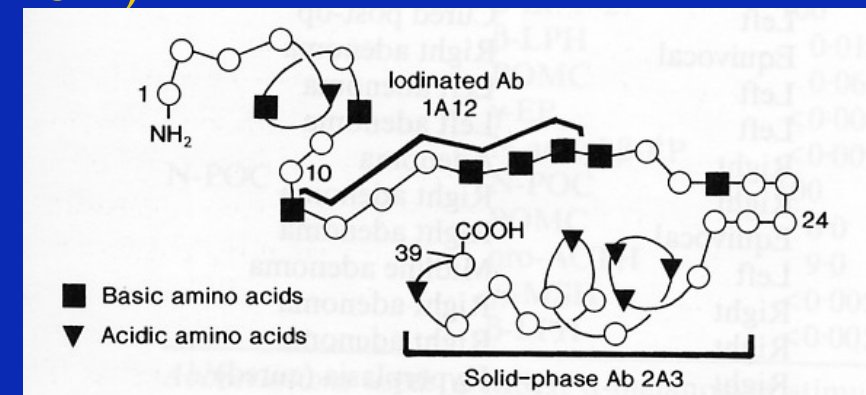
Problematiche analitiche della misura dell'ACTH

- 1948: 1° saggio biologico per l'ACTH
- Anni '60-'70: metodi RIA
- L'ACTH è una molecola con sequenza molto conservata nelle diverse specie animali (primi 24 aa) e molto instabile:
→ difficoltà di ottenere in animali (es. coniglio) anticorpi anti-ACTH umano di elevata affinità
- L'ACTH radiomarcato è poco stabile
- Schema analitico competitivo + scarsa caratterizzazione epitopica degli Ac utilizzati (policlonali): □ scarsa sensibilità, effetti matrice, reazioni crociate (POMC, ecc.)



Problematiche analitiche della misura dell'ACTH

- 1984: 1° saggio IRMA a due siti (sandwich) non competitivo
- 1985: impiego di anticorpi monoclonali
- Metodi più “robusti”, specifici, precisi e sensibili
possibilità di studiare pulsatilità e ritmo circadiano nei soggetti normali e nei pz. con malattie correlate all'ACTH
- possibilità di eseguire test dinamici e funzionali (CRH, cateterismo dei seni petrosi inferiori)



Problematiche analitiche della misura dell'ACTH

Method (product code)	Method principle	Detection method	Calibration	Antibody specificity	Species recognized	Negative interference	Range of dose-response curve (ng/L)
DPC Immulite (LKAC1) ⁷⁰	Solid-phase two-site immunometric	Enzyme-amplified (alkaline phosphatase) chemiluminescence	Human ACTH 1-39	Monoclonal N-terminal, polyclonal C-terminal	ACTH 1-24 ≤ 0.05% ACTH 1-18 ≤ 0.003% ACTH 18-39 ≤ 15% ACTH 22-39 ND αMSH ND		19-2060
Nichols Advantage (62-7004)	Solid-phase two-site immunometric	Chemiluminescence (acridinium ester)	Human ACTH 1-39 (NHPP)	Monoclonal, goat polyclonal	No significant reactivity with: ACTH 1-24 ACTH 11-24 ACTH 18-39 (CLIP) ACTH 1-10 αMSH βMSH β-Endorphin		6-1500
Nichols Allegro (40-2194)	Coated-bead, solid-phase two-site immunometric	Radioactivity	Human ACTH 1-39 (NHPP)	Monoclonal ACTH 1-17 (label), polyclonal ACTH C-terminal	No significant reactivity with: ACTH 1-24 < 7% ACTH 11-24 0% ACTH 18-39 (CLIP) < 2.5% ACTH 1-10 0% αMSH 0% βMSH 0% β-Endorphin 0%		5-1400
Nichols CHEMI (60-4175)	Solid-phase two-site immunometric	Chemiluminescence	Human ACTH 1-39 (NHPP)	Monoclonal N-terminal, goat polyclonal C-terminal	No significant reactivity with: ACTH 1-24 4.2% ACTH 11-24 0.02% ACTH 18-39 (CLIP) 2% ACTH 1-10 2% αMSH 0.92% βMSH 0.02% β-Endorphin 0.06%		6-1550
CIS Bio International ELSA IRMA	Coated-tube, solid-phase two-site immunometric	Radioactivity	Synthetic ACTH 1-39	Monoclonal ACTH N-terminal (capture), ACTH C-terminal monoclonal (label)	ND with: ACTH 34-39 ACTH 4-10 ACTH 1-10 ACTH 1-4 ACTH 11-24 ACTH 6-24 ACTH 1-24 αMSH		20-2000
BRAHMS Dynotest (65.1)	Coated-tube, solid-phase two-site immunometric	Radioactivity	ACTH 1-39	Monoclonal ACTH 34-39 (label), monoclonal ACTH 15-21 (capture)	No significant cross-reaction with: ACTH 1-10 ACTH 1-17 ACTH 1-24 ACTH 11-24 ACTH 7-38 ACTH 23-39 αMSH βMSH β-Endorphin	High concentrations (≥ 20 000 pg/mL) of ACTH 1-17, ACTH 1-24 and ACTH 7-38 negatively interfere	5-1500

Talbot et al, 2003



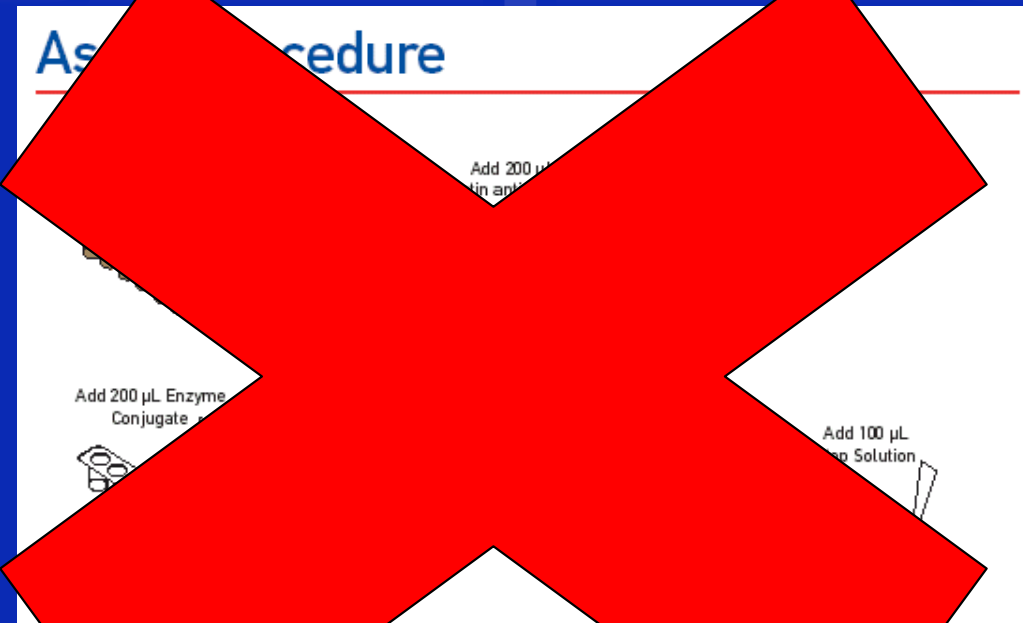
Problematiche analitiche della misura dell'ACTH

Method (product code)	Sample requirement	Hook effect	Sensitivity*
DPC Immulite (LKAC1) ⁷⁰	EDTA plasma tubes on ice	> 908 000 ng/L	9 ng/L (zero standard +2SD)
Nichols Advantage (62-7004)	Siliconized EDTA plasma	> 20 000 ng/L	1 ng/L (based on intra-assay precision of zero standard)
Nichols Allegro (40-2194)	EDTA plasma	> 20 000 ng/L	1 ng/L (zero standard +2SD)
Nichols CHEMI (60-4175)	EDTA plasma	> 20 000 ng/L	0.5 ng/L (95% CL of zero standard)
In-house RIA direct ^{43,47}	EDTA plasma		11 ng/L (ED ₁₀ 15 ng/L)
In-house RIA extracted ⁶⁹	EDTA or lithium heparin		10 ng/L (20 ng/L when label deteriorates)
In-house IRMA ⁵⁰	Lithium heparin (and EDTA)	≥ 5000 ng/L	3.5 ng/L (zero standard +2.5SD)
CIS Bio International ELSA IRMA	EDTA plasma	Dilute if high values are anticipated	2 ng/L (detection limit)
BRAHMS Dynotest	EDTA plasma tubes on ice		1.2 ng/L (zero standard +3SD) Functional sensitivity (20% inter-assay CV) 2.4 ng/L
Euro-Diagnostica IRMA	EDTA plasma	50 000 ng/L	1 ng/L (zero standard +2SD)
Mitsubishi Yuka (Immunodiagnostic Systems Ltd)	EDTA plasma		0.55 ng/L (zero standard +2SD)

Talbot et al, 2003



Pro-opiomelanocortina (POMC) Elisa



- The NEW OCTEIA™ ACTH-44-67 ELISA actually measures ACTH precursors (i.e. reads both POMC and pro-ACTH) in plasma samples, and thus provide an invaluable tool to researchers investigating pituitary function and the HPA axis.
- The assay offers outstanding accuracy and precision both within and between assay at <8% and <12% respectively. The assay is highly sensitive, <12 pmol/L with a convenient working range of 12-1200 pmol/L.
- The relative proportions of precursors:ACTH is of interest in the aetiology of Cushing syndrome and in precursor processing in tumours of different types and origins.



ACTH: standardizzazione

- Non esiste uno standard internazionale di riferimento per l'ACTH.
- Vengono utilizzate preparazioni umane purificate (NIBSC 74/555) o sintetiche (Bachem, NHPP). Tali preparazioni possono risultare significativamente diverse in termini di potenza relativa.
- Alle preparazioni NIBSC e NHPP è stata assegnata una potenza biologica (IU), ottenuta contro il 3° standard internazionale (IS) per l'ACTH porcino (contenente impurezze).
- NIBSC (12.4 IU per 50 µg), NHPP (4.7 IU per 50 µg).
- *L'immunoreattività di queste preparazioni risulta simile*



ACTH: standardizzazione

Preanalytical stability of Adrenocorticotropic Hormone depends on time to centrifugation rather than temperature

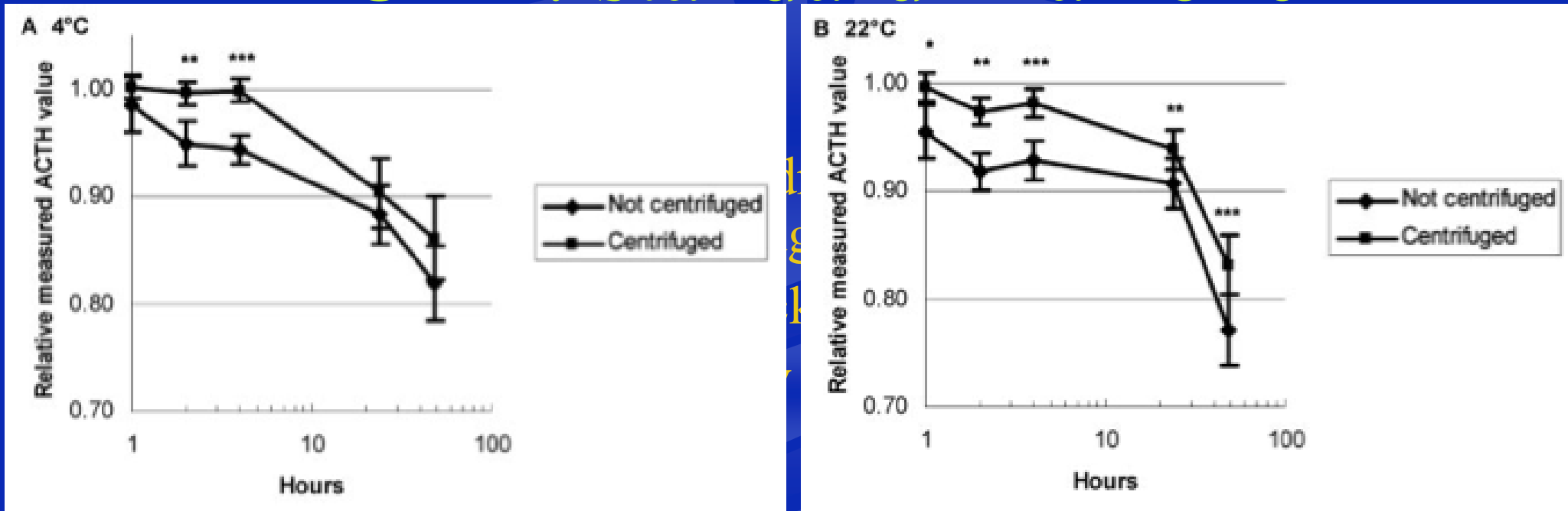
N. Reisch, M. Reincke, M. Bidlingmaier

Clinical Chemistry (Letters) 53, 2007

La temperatura durante la fase pre-analitica ha minore influenza sulla stabilità dell'ACTH rispetto al tempo intercorso tra il prelievo e la centrifugazione del campione. È raccomandata la centrifugazione e la separazione del plasma entro 4 h dal prelievo.



ACTH: standardizzazione



La temperatura durante la fase pre-analitica ha minore influenza sulla stabilità dell'ACTH rispetto al tempo intercorso tra il prelievo e la centrifugazione del campione. È raccomandata la centrifugazione e la separazione del plasma entro 4 h dal prelievo.



Ragioni cliniche per richiedere la misura dell'ACTH

- Rispetto al passato è molto aumentato il numero dei laboratori che determinano l'ACTH mediante immunoanalizzatori automatici
- La misura dell'ACTH viene talvolta richiesta in modo inappropriato (es. valutazione iniziale di pz. con sospetta S. di Cushing)
- La misura dell'ACTH è importante nella diagnosi differenziale della S. di Cushing: ACTH-dipendente o indipendente

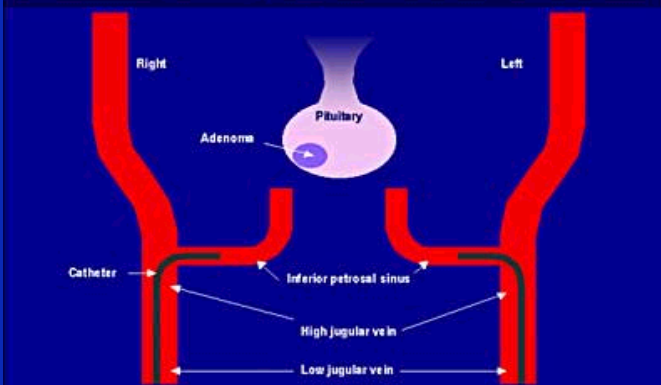


Ragioni cliniche per richiedere la misura dell'ACTH

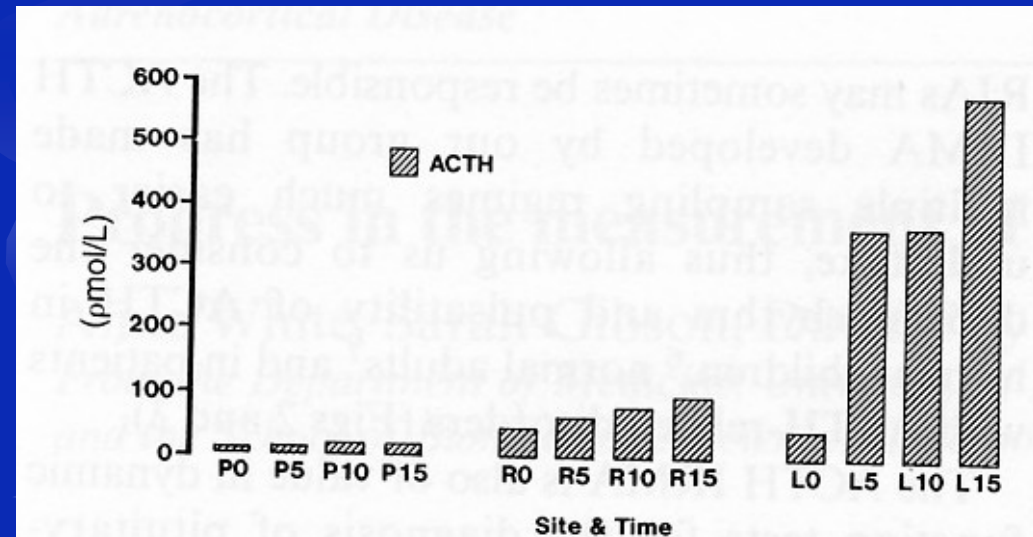
E' importante misurare l'ACTH nella diagnosi differenziale delle forme ACTH-dipendenti in particolare:

- nella sindrome da secrezione ectopica di ACTH
- nei soggetti sottoposti a cateterismo bilaterale dei seni petrosi inferiori (valore basale e dopo stimolo con CRF)

Simultaneous bilateral inferior petrosal sinus sampling for ACTH



	Plasma ACTH (ng/l) after hCRH 100ug I.V.		
	0 min	5 min	10 min
Left inferior petrosal sinus	18	30	34
Right inferior petrosal sinus	19	490	300
Simultaneous peripheral vein	16	17	30



Ragioni cliniche per richiedere la misura dell'ACTH

E' anche importante misurare l'ACTH:

- **nel controllo dei pz. con tumori ipofisari ACTH-secermenti (es. sindrome di Nelson)**
- **nella diagnosi differenziale dell'insufficienza corticosurrenalica (M. di Addison)**
- **nella diagnosi delle forme di ipopituitarismo con deficit di ACTH**



Disease state

Cause

ACTH

Cushing's Syndrome

Bilateral adrenal hyperplasia

↑ or N, but elevated for Cortisol level

1° adrenal abnormality adenoma, carcinoma

↓ or undetectable

Ectopic ACTH syndrome

Non-pituitary malignant tumour

↑↑

Adrenocortical Insufficiency

Primary (Addison's Disease)

↓↓

Destruction of the adrenal cortex or abnormalities of the pituitary or hypothalamus

Secondary with hypopituitarism

↓

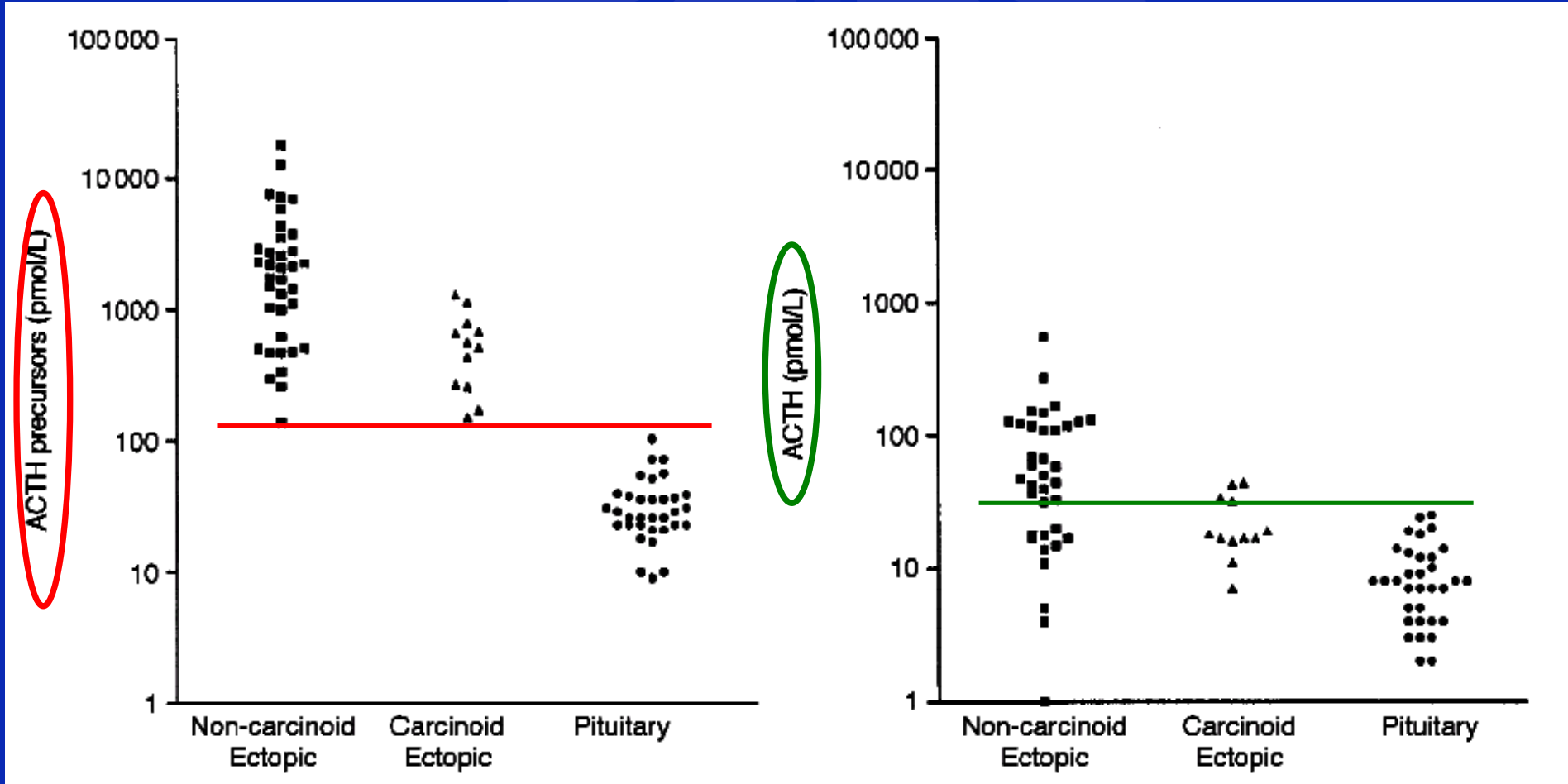
Nelson's syndrome

Aggressive ACTH producing pituitary tumors

↑↑



ACTH e precursori dell'ACTH



CONCLUSIONI

- **Anche nel caso dell'ACTH sono andati affermandosi i metodi IMA su immunoanalizzatori automatici**
- **La misura dell'ACTH, nonostante ciò, non dovrebbe essere considerata un test diagnostico di 1° livello**
- **Essa necessita di una stretta e fattiva collaborazione fra clinico e laboratorista**

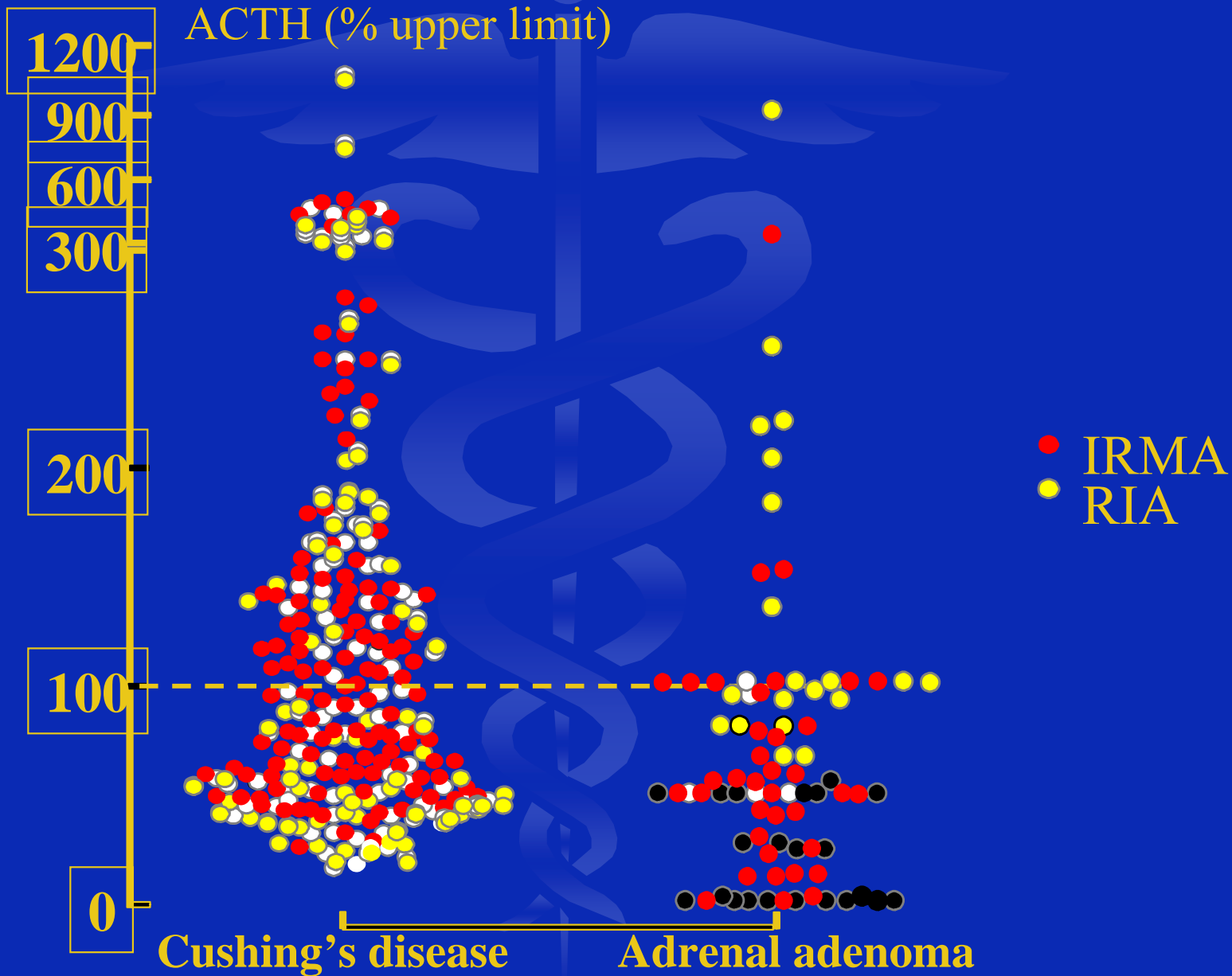


CONCLUSIONI

- **Anche nel caso dell'ACTH sono andati affermandosi i metodi IMA su immunoanalizzatori automatici**
- **La misura dell'ACTH, nonostante ciò, non dovrebbe essere considerata un test diagnostico di 1° livello**
- **Essa necessita di una stretta e fattiva collaborazione fra clinico e laboratorista**



ACTH VALUES in PATIENTS with CUSHING'S SYNDROME



Modificato da Invitti et al., 1999



