



DCM053-10
Ed. 10/2016

ALDOSTERONE ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta dell'Aldosterone in siero umano, plasma umano o in urine

IVD



Vedere etichetta esterna

LOT

2°C - 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO053

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di Aldosterone in siero umano, plasma umano o in urine.

Il kit Aldosterone ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'aldosterone è un ormone steroideo prodotto dalla corteccia surrenale nella ghiandola adrenale, è il mineralcorticoide più diffuso negli esseri umani, regola l'equilibrio del potassio e del sodio nel sangue.

La secrezione dell'aldosterone sembra essere regolata attraverso il sistema rene-angiotensina.

L'aldosterone agisce sui recettori dei mineralcorticoidi (MR) delle cellule renali aumentando la permeabilità della membrana apicale (lume) al potassio ed al sodio ed attiva le pompe Na⁺/K⁺, stimola l'idrolisi dell'ATP, il riassorbimento sanguigno di acqua e sodio e l'escrezione del potassio nelle urine. L'aldosterone è coinvolto nella regolazione del bicarbonato (HCO₃⁻) nel plasma e dell'equilibrio acido/base.

L'aldosterone è responsabile del riassorbimento di circa 2% del sodio filtrato dai reni.

I livelli di aldosterone nel plasma normalmente variano con la posizione del corpo (in piedi > supino) e con l'assunzione di sali. I livelli di aldosterone del plasma mostrano un ritmo circadiano simile, ma meno marcato, al cortisolo, con picchi al mattino; circa 75% della produzione quotidiana è secreto fra 04:00 e 10:00 ogni giorno. I livelli tendono a diminuire con l'età.

Concentrazioni elevate di aldosterone nel plasma possono occorrere in adenomi, iperaldosteronismo e idiopatie glucocorticoide-sensibili.

La secrezione anormalmente bassa dell'aldosterone si presenta in casi come l'iperplasia adrenale congenita, nefropatia e acidosi tubolare renale.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il presente test immunoenzimatico segue le tipiche regole di un saggio competitivo.

La competizione si verifica tra un antigene non marcato (presente nei calibratori e nei campioni) e l'antigene marcato con enzima HRP (coniugato) per un numero limitato di siti di legame degli anticorpi nella piastra. Le fasi di lavaggio rimuovono il

materiale non legato. Successivamente viene aggiunto il substrato enzimatico (TMB). La reazione enzimatica termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di Aldosterone nel campione. Un lettore per micro piastre misura l'assorbanza. Una serie di calibratori è utilizzata per tracciare una curva di calibrazione da cui risalire alla concentrazione di Aldosterone nel campione e nei controlli.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/5306-0
CAL1	REF DCE002/5307-0
CAL2	REF DCE002/5308-0
CAL3	REF DCE002/5309-0
CAL4	REF DCE002/5310-0
CAL5	REF DCE002/5311-0

2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi REF DCE045/5303-0

3. Conjugate (1 flacone, 1 mL)

Aldosterone coniugato con perossidasi di rafano (HRP) REF DCE002/5302-0

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti Aldosterone adsorbito sulla micropiastra REF DCE002/5303-0

5. Incubation Buffer (1 flacone, 30 mL)

Tampone fosfato 50 mM pH 7,5, BSA 1 g/L REF DCE001-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle) REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle) REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L REF DCE006-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letture per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strips da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo permette la determinazione dell'Aldosterone con concentrazioni che vanno da 20 a 2000 pg/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Aldosterone.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le

fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.

- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

Prima dell'uso lasciare su agitatore rotante per almeno 5 minuti.

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni di Aldosterone:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	20	80	300	800	2000

Stabili 6 mesi dall'apertura dei flaconcini a 2-8°C.

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del Coniugato Diluito

Preparare immediatamente prima dell'uso.

Diluire il coniugato 1:50 con Incubation buffer (es. 20 µL di Conjugate possono essere diluiti a 1 mL con Incubation buffer). Mescolare delicatamente lasciando almeno 10 minuti su agitatore rotante.

6.4. Preparazione del campione

La determinazione dell'Aldosterone può essere effettuata su plasma umano, su siero umano, o su urine.

Per l'ottenimento del plasma si sconsiglia l'utilizzo di tubi commerciali contenenti litio-eparina o sodio-eparina, in quanto potrebbero interferire con il dosaggio alterandone i risultati; si possono invece utilizzare tubi contenenti EDTA.

Per l'ottenimento del siero, si specifica che i tubi SST ("Serum Separation Tube") possono essere utilizzati senza avere interferenze con il dosaggio.

Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20°C.

Per campioni con concentrazioni superiori a 2000 pg/mL diluirli con il Calibratore zero.

Per la determinazione nelle Urine vedi allegato A.

Il Controllo è pronto all'uso.

6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campioni /Controllo	Bianco
Calibratori C ₀ -C ₅	50 µL		
Campioni/Controllo		50 µL	
Coniugato Diluito	100 µL	100 µL	

Incubare 1 h a +37°C.

Allontanare la miscela di reazione; lavare 3 volte aggiungendo in ogni pozzetto 0,3 mL di wash solution diluita.

Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente.

Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.

TMB substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 20 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Aldosterone per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare il grafico dell'assorbanza in funzione delle concentrazioni dei Calibratori (C₀-C₅). Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in pg/mL.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Siero:		pg/mL	
<i>Adulti sani</i>		Media	Range
Mattino presto, Supino		68,9	20-180
In piedi, 2 ore		109,2	30-400
Urina nelle 24 ore:		µg/giorno	
<i>Adulti sani</i>	<i>Volume</i>	Media	Range
Urina	1650 mL	11,83	2-22

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (15x) la misura di due differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è 9,7%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 11%.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su due campioni arricchiti con 0, 300, 800, 2000 (pg/mL) di Aldosterone, ha dato un valore medio (\pm SE) di 103,94% \pm 2,78%.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di Aldosterone misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è di 7 pg/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate al 50% secondo Abraham:

Aldosterone	100%
11-Desossicorticosterone	1,10%
Androsterone	< 0,001%
Cortisone	< 0,001%
11-Desossicortisolo	< 0,001%
21-Desossicortisolo	< 0,001%
Diidrotestosterone	< 0,001%
Estradiolo	< 0,001%
Estriolo	< 0,001%
Estrone	< 0,001%
Testosterone	< 0,001%

10.5. Correlazione con il dosaggio RIA

Il kit Aldosterone ELISA Diametra è stato comparato con un kit RIA disponibile in commercio. Sono stati dosati 56 campioni di siero. La curva di regressione è:
 $y = 1,03x + 1,64$
 $r^2 = 0,99$
 $y =$ Aldosterone Diametra Elisa Kit
 $x =$ Aldosterone Adaltis MAIA RIA Kit

Sono stati dosati 14 campioni di urine. La curva di regressione è:
 $y = 0,86x + 12,53$
 $r^2 = 0,92$
 $y =$ Aldosterone Diametra Elisa Kit
 $x =$ Aldosterone Adaltis MAIA RIA Kit

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Himathongkam, T. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 41/1 :153-159, 1975.
2. Lun, S., et al, Clin. Chem. 29/2:268-271, 1983.
3. Carledge, S. and Lowson, N., Ann. Clin. Biochem. 37:262-278, 2000.
4. Sequeira, S. J. Et al., Ann. Clin. Chem. 37/11:1987-1989, 1991.
5. Miller, M.A., et al., Clin. Chem. 43/10: 1995-1997, 1997.
6. Stabler and Siegel, A.L., Clin. Chem. 37/11: 1987-1989, 1991.
7. Vallotton M. B., Clin. Endocrinol. 45: 47-52, 1996.
8. Oelkers, W., et al., J. Clin. Endocrinol Metab. 75: 259-264, 1992.
9. Ad Dujaili, E.A.S., and Edwards, C. R. W., J. Steroid Biochem. 14: 481-487, 1981.
10. Corry, D. B., and Tuck, M. L. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 24: 511-528, 1995.

Ed. 10/2016

DCM053-10

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354
Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

Allegato A

Preparazione del campione: urina

Precauzioni: l'acetato di etile è un solvente organico volatile, infiammabile. Condurre la fase di evaporazione sotto cappa d'aspirazione explosion-proof dotata di aspiratore per gas di scarico. Evitare fiamme libere, e non pipettare con la bocca. L'acetato di etile deve essere almeno di grado spettrofotometrico.

1 Etichettare una provetta di vetro o di polipropilene per ogni campione di urina.

Le provette devono avere tappi ben sigillati ed essere in grado di sopportare centrifugazione a 1500xg

2 Dispensare **250 µL** di ogni campione di urina nella provetta appropriata.

Se il campione è torbido o se si è formato un precipitato, centrifugare prima le urine e lavorare con il surnatante.

3 Idrolisi: Aggiungere **25 µL** di HCl 3,2 N (non fornito) per ogni provetta. Tappare bene e incubare per 24 ore a temperatura ambiente al buio.

L' HCl 3,2 N può essere preparato con l'aggiunta di 1,0 mL di HCl concentrato (12N) a 2,75 mL di acqua distillata. Non aggiungere mai l' acqua all' acido concentrato, poiché provoca una reazione violenta con proiezioni di acido.

4 Estrazione: Aggiungere **2,5 mL** di acetato di etile (non fornito) per ogni provetta. Tappare bene.

5 Miscelare capovolgendo gentilmente per **60 minuti**. Utilizzare un rotatore meccanico impostato a 15-20 giri al minuto.

6 Centrifugare per **5 minuti** a circa 1500xg, per separare i due strati.

Ogni campione parzialmente emulsionato deve essere agitato vigorosamente e centrifugato di nuovo.

7 Evaporazione: Trasferite esattamente **100 µL** della fase superiore (acetato di etile) in una provetta di polipropilene semplice (non rivestita) 12x75 mm. (Non usare polistirene). Pipettare direttamente sul fondo della provetta utilizzando una micropipetta volumetrica.

Il resto della fase di acetato di etile può essere mantenuta per un uso futuro, semplicemente congelando a -20°C la provetta dove è avvenuta l'estrazione; non è necessario separare la fase di acetato di etile dalla fase acquosa.

8 Evaporare a 37°C fino a completo essiccamento sotto leggera corrente di azoto.

9 Aggiungere **0,5 mL** di Incubation buffer **REF DCE001-0** (reagente ausiliario) o di soluzione fisiologica (NaCl 0,9%). Risospendere accuratamente l'estratto nel vortex.

10 Trasferire **50 µL di risospeso nel pozzetto della micropiastra**

Procedere con la procedura del test, come descritto nella IFU (utilizzando il risospeso come campione normale)

Calcolo Campioni di Urina: Il risultato in "pg / mL", così come viene letto dalla curva di taratura deve essere moltiplicato per 100 per ottenere la concentrazione di aldosterone, in picogrammi per millilitro, del campione di urina originale, non estratto.

Per ottenere l'escrezione di aldosterone nelle 24 ore espressa in microgrammi al giorno (µg/di), dividere il numero ottenuto per 1000, poi moltiplicare per il volume totale espresso in litri,. (Un fattore di correzione pari a 100 viene utilizzato in quanto i campioni di urina sono diluiti due volte 1 a 10: prima con l'estrazione 0,25 mL di urina in 2,5 mL di acetato di etile, poi ricostituendo il residuo di evaporazione (0,1 mL) a 0,5 mL con Incubation buffer (o soluzione fisiologica) e utilizzando 50 µL dello stesso.

L'aggiunta di acido cloridrico durante la fase di idrolisi non ha alcun effetto sulla diluizione.



DCM053-10
Ed. 10/2016

ALDOSTERONE ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Aldosterone in human serum, human plasma or urine.

IVD



LOT

See external label

2°C - 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO053

INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Aldosterone concentration in human serum, human plasma or urine.

Aldosterone ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Aldosterone is a steroid hormone produced by the adrenal cortex in the adrenal gland, is the most potent mineralocorticoid in humans, it regulate sodium and potassium balance in the blood.

Aldosterone secretion appears to be stimulated primarily through the renin-angiotensin system.

Acting on mineralocorticoid receptors (MR) on principal cells in the collecting ducts of the kidneys, it increases the permeability of their apical (luminal) membrane to potassium and sodium and activates their basolateral Na⁺/K⁺ pumps, stimulating ATP hydrolysis, reabsorbing sodium (Na⁺) ions and water into the blood, and excreting potassium (K⁺) ions into the urine. Aldosterone regulate plasma bicarbonate (HCO₃⁻) levels and its acid/base balance.

Aldosterone is responsible for the reabsorption of about 2% of filtered sodium in the kidneys.

Plasma aldosterone levels normally vary with body position (upright>supine) and salt intake. Overall plasma aldosterone levels show a circadian rhythm which is similar to but less marked than cortisol, with peak levels in the early morning; about 75% of the daily production is secreted between 04:00 am and 10:00 am each day. Age-related levels tend to decline from fetal through adult life.

Abnormally high plasma aldosterone concentrations can occur in adenomas, glucocorticoid-responsive hyperaldosteronism, idiopathic.

Abnormally low aldosterone secretion occurs in a number of conditions including salt-wasting forms of congenital adrenal hyperplasia, nephropathy, and renal tubular acidosis.

2. PRINCIPLE

The principle of this enzyme immunoassay test follow the typical competitive binding scenario. Competition occurs between an unlabeled antigen (present in calibrators, control and patient samples) and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited

number of antibody binding site on the microwell plate. The washing steps remove unbound materials. After the washing step, the enzyme substrate (TMB) is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the Stop Solution. The intensity of the colour is inversely proportional to the concentration of Aldosterone in the sample. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. A set of calibrators is used to plot a calibration curve from which the amount of Aldosterone in patient samples and controls can be directly read.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/5306-0
CAL1	REF DCE002/5307-0
CAL2	REF DCE002/5308-0
CAL3	REF DCE002/5309-0
CAL4	REF DCE002/5310-0
CAL5	REF DCE002/5311-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

Control concentration is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/5303-0

3. Conjugate (1 vial, 1 mL)

Aldosterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/5302-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with anti aldosterone antibody

REF DCE002/5303-0

5. Incubation Buffer (1 vial, 30 mL)

50 mM phosphate buffer pH 7.5, BSA 1 g/L

REF DCE001-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents between 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Aldosterone from 20 to 2000 pg/mL
- The treatment with natural or synthetic steroids can affect blood levels of aldosterone.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.

- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

Leave on a rotating mixer for at least 5 minutes before using.

The Calibrators are ready to use and have the following concentration:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	20	80	300	800	2000

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of Wash Buffer

Dilute the content of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

6.3. Preparation of Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Dilute the Conjugate 1:50 into Incubation buffer (e.g. 20 µL of Conjugate can be diluted to 1 mL with Incubation buffer). Mix gently for almost ten minutes on a rotating mixer.

6.4. Preparation of the Sample

The determination of Aldosterone can be performed in human serum, human plasma or in urine.

For plasma samples it is advised to avoid the use of lithium-eparine or sodium-eparine tubes, because they could interfere with the assay giving, in the end,

wrong results; tubes with EDTA can be used without interferences.

For serum samples the SST tubes ("Serum Separation Tube) can be used without any interference with the assay.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample connection.

For sample with concentration over 2000 pg/mL dilute the sample with Calibrator 0.

For Urine determination please see annex A.

The Control are ready to use.

6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Samples/ Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	50 µL		
Samples/ Control		50 µL	
Diluted Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at +37°C for 1 hour. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22±28°C) for 20 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Aldosterone for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the values of absorbance (E_m) of the Calibrators (C₀-C₅) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in pg/mL.

9. REFERENCE VALUES

Serum:		pg/mL	
<i>Healthy Adult</i>		Mean	Range
Early Morning, Supine		68.9	20-180
Upright, 2 Hours		109.2	30-400
24-Hour Urine:		µg/day	
<i>Healthy Adult</i>	Volume	Mean	Range
Urine	1650 mL	11.83	2-22

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate measurements (15x) of two different control sera in one assay. The within assay variability is 9.7%.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (10x) of three different control sera in different lots of kits. The between assay variability is 11%.

10.2. Accuracy

The recovery of 0 - 300 - 800 - 2000 (pg/mL) of Aldosterone added to two patient samples gave an average value (\pm SE) of 103.94% \pm 2.78%.

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Aldosterone that can be distinguished from the Calibrator 0 is 7 pg/mL at the 95% confidence limit.

10.4. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham are shown in the table:

Aldosterone	100%
11-Deoxicorticosterone	1.10%
Androsterone	< 0.001%
Cortisone	< 0.001%
11-Deoxicortisol	< 0.001%
21-Deoxicortisol	< 0.001%
Dihydrotestosterone	< 0.001%
Estradiol	< 0.001%
Estriol	< 0.001%
Estrone	< 0.001%
Testosterone	< 0.001%

10.5. Correlation with RIA

Diametra Aldosterone ELISA was compared to a commercially available Aldosterone RIA assay. 56 serum samples were tested. The linear regression curve was calculated:

$$y = 1.03x + 1.64$$

$$r^2 = 0.99$$

y = Aldosterone Diametra Elisa Kit

x = Aldosterone Adaltis MAIA RIA Kit

14 urine samples were tested. The linear regression curve was calculated:

$$y = 0.86x + 12.53$$

$$r^2 = 0.92$$

y = Aldosterone Diametra Elisa Kit

x = Aldosterone Adaltis MAIA RIA Kit

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Himathongkam, T. et al.,
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41/1 :153-159, 1975.
2. Lun, S., et al,
Clin. Chem. 29/2:268-271, 1983.
3. Carledge, S. and Lowson, N.,
Ann. Clin. Biochem. 37:262-278, 2000.
4. Sequeira, S. J. Et al.,
Ann. Clin. Chem. 37/11:1987-1989, 1991.
5. Miller, M.A., et al.,
Clin. Chem. 43/10: 1995-1997, 1997.
6. Stabler and Siegel, A.L.,
Clin. Chem. 37/11: 1987-1989, 1991.
7. Vallotton M. B.,
Clin. Endocrinol. 45: 47-52, 1996.
8. Oelkers, W., et al.,
J. Clin. Endocrinol Metab. 75: 259-264, 1992.
9. Ad Dujaili, E.A.S., and Edwards, C. R. W.,
J. Steroid Biochem. 14: 481-487, 1981.
10. Corry, D. B., and Tuck, M. L.,
Endoc. Metab. Clin. North Am. 24: 511-528, 1995.

Ed. 10/2016

DCM053-10

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

Annex A

Sample Preparation: Urine

Precautions: Ethyl acetate is a volatile, flammable organic solvent. Conduct the evaporation step under a fume hood equipped with an explosion-proof exhaust fan. Avoid open flames, and do not pipet by mouth. The ethyl acetate must be of at least spectrophotometric grade.

1 Label one glass or polypropylene tube for each urine sample.

The tubes should have tight-fitting caps and be able to withstand centrifuging at 1500xg

2 Pipet **250 µL** of each urine sample into the appropriate tube.

If the sample is cloudy or if a precipitate has formed, first centrifuge the urine and work with the supernatant.

3 Hydrolysis: Add **25 µL** of 3.2 N HCl (not supplied) to every tube. Cap securely and incubate for 24 hours at room temperature *in the dark*.

3.2 N HCl can be made by adding 1.0 mL concentrated HCl (12M) to 2.75 mL distilled water. Do not add water to concentrated acid, since this may cause splattering.

4 Extraction: Add **2.5 mL** ethyl acetate (not supplied) to every tube. Cap securely.

5 Mix by gentle inversion for **60 minutes**.

Use a mechanical rotator set at 15–20 revolutions-per-minute.

6 Centrifuge for **5 minutes** at about 1500xg, to separate the two layers.

Any sample partially emulsified should be shaken vigorously and centrifuged again.

7 Evaporation: Transfer exactly **100 µL** of the upper (ethyl acetate) phase cleanly into one plain (uncoated) 12x75 mm polypropylene tube.

(Do not use polystyrene) Pipet directly to the bottom of the tube using a positive-displacement micropipet.

The remainder of the ethyl acetate phase may be retained for future use simply by freezing the extraction tube at –20°C;

it is not necessary to separate the ethyl acetate phase from the aqueous phase.

8 Evaporate to complete dryness under a gentle stream of nitrogen at 37°C.

9 Add **0.5 mL** of the Incubation buffer **REF DCE001-0** (auxiliary reagent) or saline solution NaCl 0.9%.

Thoroughly resuspend the extract by vortexing.

10 Transfer **50 µL of Resuspend to the well of coated microplate**

Proceed with the assay procedure, as described in the IFU (using the resuspended as normal sample)

Calculation Urine Samples: The result in "pg/mL" as read from the calibration curve must be multiplied by 100 to obtain the aldosterone concentration, in picograms per milliliter, of the original, unextracted urine sample.

Divide this figure by 1,000, then multiply by the total volume *in liters*; to report the 24-hour aldosterone output in micrograms per day.

(A correction factor of 100 is used because the urine samples are twice diluted 1-in-10: first by extracting 0.25 mL urine into 2.5 mL ethyl acetate, then by reconstituting the residue of 0.1 mL in 0.5 mL of Incubation buffer (Saline Solution) and using 50 µL of it.

The addition of hydrochloric acid during the hydrolysis step has no effect on the dilution.



DCM053-10
Ed. 10/2016

ALDOSTERONE ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la aldosterona en suero humano, plasma humano o en orina

IVD



LOT
Ver etiqueta externa

2°C - 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO053

USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de aldosterona en suero humano, plasma humano o en orina.

El kit Aldosterona ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La aldosterona es una hormona esteroidea producida por la corteza suprarrenal en la glándula suprarrenal, es el mineralocorticoide más común en los seres humanos, regula el equilibrio de potasio y de sodio en la sangre. La secreción de aldosterona parece estar regulada por el sistema renina-angiotensina.

La aldosterona actúa sobre los receptores de mineralocorticoides de las células renales, aumentando la permeabilidad de la membrana apical (luz) al potasio y al sodio, y activa las bombas Na⁺/K⁺, estimula la hidrólisis de ATP, la reabsorción sanguínea de agua y sodio, y la secreción de potasio en la orina. La aldosterona está involucrada en la regulación del equilibrio ácido/base.

La aldosterona es responsable de la reabsorción de aproximadamente el 2% del sodio filtrado por los riñones. Los niveles de aldosterona en plasma normalmente varían según la posición del cuerpo (de pie > supino). Los niveles de aldosterona en plasma muestran un ritmo circadiano similar al cortisol, con picos matutinos; aproximadamente el 75% de la producción diaria es secretada entre las 04:00 y las 10:00 cada día. Los niveles tienden a disminuir con la edad. Pueden observarse concentraciones elevadas de aldosterona en plasma, por ejemplo, en adenomas e hiperaldosteronismo, idiopatías sensibles a los glucocorticoides.

La secreción anormalmente baja de aldosterona se presenta en casos como hiperplasia suprarrenal congénita, nefropatía y acidosis tubular renal.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Método inmunoenzimático competitivo para la determinación de aldosterona. El siguiente método tiene estas características. Después de la adición del antisuero inmovilizado, el conjugado enzima-aldosterona y el suero que contiene el antígeno aldosterona nativo, hay una reacción competitiva entre el antígeno aldosterona nativo y el conjugado

enzima-aldosterona para un número limitado de sitios de enlace inmovilizados. Tras lograr el equilibrio, el conjugado unido a la fase sólida se separa de la fracción de conjugado libre mediante un lavado. La actividad del conjugado unido a la fase sólida es inversamente proporcional a la concentración de antígeno libre (aldosterona).

Utilizando los calibradores con una concentración conocida de antígeno se puede crear una curva en la que es posible interpolar una muestra con concentración desconocida de aldosterona.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/5306-0
CAL1	REF DCE002/5307-0
CAL2	REF DCE002/5308-0
CAL3	REF DCE002/5309-0
CAL4	REF DCE002/5310-0
CAL5	REF DCE002/5311-0

2. Control (1 frasco, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de análisis (Certificate of Analysis)

REF DCE045/5303-0

3. Conjugado (1 frasco, 1 mL)

Aldosterona conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/5302-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Microplaca con anticuerpo anti aldosterona absorbido

REF DCE002/5303-0

5. Tampón de incubación (1 frasco, 30 mL)

Tampón fosfato 50 mM pH 7,5; BSA 1 g/L

REF DCE001-0

6. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

8. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Nota

Conservar todos los reactivos a 2-8°C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de aldosterona de 20 a 2000 pg/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles hemáticos de aldosterona.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren

a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.

- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validado.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de parada. Tanto el sustrato como la Solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Antes del uso, dejar durante al menos 5 minutos en el agitador giratorio.

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones de aldosterona:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	20	80	300	800	2000

Estables 6 meses a 2-8°C desde la apertura de los frascos.

6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8 °C durante al menos 30 días.

6.3. Preparación del conjugado diluido

Preparar inmediatamente antes del uso.

Diluir el conjugado 1:50 con tampón de incubación (p. ej., 20 µL de conjugado de aldosterona pueden

diluirse a 1 mL con tampón de incubación). Mezclar con cuidado dejando al menos 10 minutos en el agitador giratorio.

6.4. Preparación de la muestra

La determinación de aldosterona puede realizarse en plasma humano, suero humano o en orina.

Para la obtención de plasma, no se recomienda el uso de tubos comerciales que contienen heparina de litio o heparina sódica, ya que pueden interferir con el ensayo y alterar los resultados; en cambio se pueden utilizar tubos con EDTA. Los tubos SST (Serum Separation Tube) no interfieren en los resultados y por lo tanto pueden usarse sin cuidado.

Si la dosificación no se realiza el mismo día de la extracción, conservar la muestra a -20 °C.

Para muestras con concentraciones superiores a 2000 pg/mL, diluirlas con Calibrador cero.

Para la determinación en la orina, ver anexo A.

El Control está listo para usar.

6.5. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 20 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de aldosterona para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia (E_m) en función de las concentraciones de los Calibradores (C₀-C₅). Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3. Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en pg/mL.

Reactivo	Calibrador	Muestras /Control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	50 µL		
Muestras /Control		50 µL	
Conjugado diluido	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a +37 °C. Retirar la mezcla de reacción, lavar 3 veces añadiendo a cada pocillo 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			

9. VALORES DE REFERENCIA

Suero:		pg/mL	
<i>Adultos sanos</i>		Media	Rango
Por la mañana temprano, supino		68,9	20-180
De pie, 2 horas		109,2	30-400
Orina en las 24 horas:		µg/día	
<i>Adultos sanos</i>	Volumen	Media	Rango
Orina	1650 mL	11,83	2-22

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (15x) la medición de dos sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es 9,7%.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 11%.

10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en dos muestras enriquecidas con 0 - 300 - 800 - 2000 (pg/mL) de aldosterona ha dado un valor medio (\pm SD) de 103,94% \pm 2,78%.

10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de aldosterona medible que puede distinguirse del Calibrador cero es 7 pg/mL con un límite de confianza del 95%.

10.4. Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según Abraham:

Aldosterona	100%
11-desoxicorticosterona	1,10%
Androsterona	< 0,001%
Cortisona	< 0,001%
11-desoxicortisol	< 0,001%
21-desoxicortisol	< 0,001%
Dihidrotestosterona	< 0,001%
Estradiol	< 0,001%

Estriol	< 0,001%
Estrona	< 0,001%
Testosterona	< 0,001%

10.5. Correlación con la dosis RIA

El kit Aldosterona ELISA (Diametra) se ha comparado con un kit RIA disponible en el mercado. Se han comprobado 56 muestras de suero. La curva de regresión es:

$$y = 1,03 x + 1,64$$

$$r^2 = 0,99$$

$$y = \text{kit Aldosterona Diametra Elisa}$$

$$x = \text{kit Aldosterone Adaltis MAIA RIA}$$

Se han comprobado 14 muestras de orina. La curva de regresión es:

$$y = 0,86 x + 12,53$$

$$r^2 = 0,92$$

$$y = \text{kit Aldosterona Diametra Elisa}$$

$$x = \text{kit Aldosterone Adaltis MAIA RIA}$$

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

- Himathongkam, T. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 41/1 :153-159, 1975.
- Lun, S., et al, Clin. Chem. 29/2:268-271, 1983.
- Carledge, S. and Lowson, N., Ann. Clin. Biochem. 37:262-278, 2000.
- Sequeira, S. J. Et al., Ann. Clin. Chem. 37/11:1987-1989, 1991.
- Miller, M.A., et al., Clin. Chem. 43/10: 1995-1997, 1997.
- Stabler and Siegel, A.L., Clin. Chem. 37/11: 1987-1989, 1991.
- Vallotton M. B., Clin. Endocrinol. 45: 47-52, 1996.
- Oelkers, W., et al., J. Clin. Endocrinol Metab. 75: 259-264, 1992.
- Ad Dujaili, E.A.S., and Edwards, C. R. W., J. Steroid Biochem. 14: 481-487, 1981.
- Corry, D. B., and Tuck, M. L. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 24: 511-528, 1995.

Ed. 10/2016

DCM053-10

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

Anexo A

Preparación de la muestra: orina

Precauciones: el acetato de etilo es un disolvente orgánico volátil, inflamable. Llevar a cabo la fase de evaporación bajo una campana de aspiración a prueba de explosiones, dotada de aspirador para gases de escape. Evitar llamas libres y no utilizar la pipeta con la boca. El acetato de etilo debe ser al menos de grado espectrofotométrico.

1 Etiquetar una probeta de vidrio o de polipropileno para cada muestra de orina.

Las probetas deben tener los tapones bien sellados y ser capaces de soportar un centrifugado a 1500xg

2 Dispensar **250 µl** de cada muestra de orina en la probeta adecuada.

Si la muestra está turbia o si se ha formado un precipitado, centrifugar antes la orina y trabajar con el sobrenadante.

3 Hidrólisis: Añadir **25 µl** de HCl 3,2 N (no suministrado) para cada probeta. Tapar bien e incubar durante 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad.

El HCl 3,2 N puede prepararse añadiendo 1,0 mL de HCl concentrado (12N) a 2,75 mL de agua destilada. No añadir nunca el agua al ácido concentrado, ya que provocaría una reacción violenta con proyecciones de ácido.

4 Extracción: Añadir **2,5 mL** de acetato de etilo (no suministrado) para cada probeta. Tapar bien.

5 Mezclar invirtiendo con cuidado durante **60 minutos**. Utilizar un rotador mecánico fijado en 15-20 r.p.m.

6 Centrifugar durante **5 minutos** a aproximadamente 1500xg para separar las dos capas.

Cada muestra parcialmente emulsionada debe agitarse vigorosamente y centrifugarse de nuevo.

7 Evaporación: Transferir exactamente **100 µl** de la fase superior (acetato de etilo) en una probeta de polipropileno simple (no recubierta) 12x75 mm. (No usar poliestireno). Pipetear directamente en el fondo de la probeta utilizando una micropipeta volumétrica.

El resto de la fase de acetato de etilo puede guardarse para un uso posterior simplemente congelando a -20 °C la probeta donde se ha realizado la extracción; no es necesario separar la fase de acetato de etilo de la fase acuosa.

8 Evaporar a 37 °C hasta que se seque por completo bajo una ligera corriente de nitrógeno.

9 Añadir **0,5 mL** de tampón de incubación **REF DCE001-0** (reactivo auxiliar) o de solución fisiológica (NaCl 0,9%). Resuspender con cuidado el extracto en el vórtex.

10 Transferir **50 µl de resuspendido en el pocillo de la microplaca**

Llevar a cabo el procedimiento del ensayo como se describe en las Instrucciones para el uso (utilizando el resuspendido como muestra normal)

Cálculo muestras de orina: El resultado en “pg/mL”, como se lee en la curva de calibrado, debe multiplicarse por 100 para obtener la concentración de aldosterona, en picogramos por mililitro, de la muestra de orina original, no extraída.

Para obtener la secreción de aldosterona en las 24 horas expresada en microgramos por día (µg/día), dividir el número obtenido por 1000 y después multiplicar por el volumen total expresado en litros. (Se utiliza un factor de corrección igual a 100 puesto que las muestras de orina se diluyen dos veces 1 a 10: primero con la extracción 0,25 mL de orina en 2,5 mL de acetato de etilo, después reconstituyendo el residuo de evaporación (0,1 mL) a 0,5 mL con tampón de incubación (o solución fisiológica) y utilizando 50 µl del mismo.

La adición de ácido clorhídrico durante la fase de hidrólisis no tiene ningún efecto sobre la dilución.

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs