

Instructions for Use

Aldosterone ELISA

IVD



REF EIA-5298



96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos / Sommaire

| | | |
|----|---|----|
| 1 | INTRODUCTION | 2 |
| 2 | PRINCIPLE OF THE TEST | 2 |
| 3 | WARNINGS AND PRECAUTIONS | 3 |
| 4 | REAGENTS | 4 |
| 5 | SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION | 5 |
| 6 | ASSAY PROCEDURE | 7 |
| 7 | EXPECTED NORMAL VALUES | 8 |
| 8 | QUALITY CONTROL | 9 |
| 9 | PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 9 |
| 10 | LIMITATIONS OF USE | 10 |
| 11 | LEGAL ASPECTS | 11 |

| | | |
|----|-----------------------------|----|
| 1 | EINLEITUNG | 12 |
| 2 | TESTPRINZIP | 12 |
| 3 | VORSICHTSMAßNAHMEN | 13 |
| 4 | BESTANDTEILE DES KITS | 14 |
| 5 | PROBENVORBEREITUNG | 15 |
| 6 | TESTDURCHFÜHRUNG | 17 |
| 7 | ERWARTETE WERTE | 18 |
| 8 | QUALITÄTSKONTROLLE | 19 |
| 9 | ASSAY CHARACTERISTIKA | 19 |
| 10 | GRENZEN DES TESTS | 19 |
| 11 | RECHTLICHE GRUNDLAGEN | 20 |

| | | |
|----|----------------------------------|----|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 21 |
| 2 | FUNDAMENTO DEL ENSAYO | 21 |
| 3 | PRECAUCIONES | 21 |
| 4 | COMPONENTES DEL KIT | 22 |
| 5 | MUESTRAS | 23 |
| 6 | PROCEDIMIENTO DE ENSAYO | 25 |
| 7 | VALORES ESPERADOS | 26 |
| 8 | CONTROL DE CALIDAD | 27 |
| 9 | CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO | 27 |
| 10 | LIMITACIONES DE USO | 27 |
| 11 | ASPECTOS LEGALES | 28 |

| | | |
|----|-------------------------------|----|
| 12 | REFERENCES / LITERATURE | 29 |
| | SYMBOLS USED | 30 |

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DRG Aldosterone ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of aldosterone in serum, plasma (EDTA-, heparin- or citrate plasma) and urine.

1.2 Summary and Explanation

The steroid hormone aldosterone is a potent mineral corticoid that is produced by the zona glomerulosa of the adrenal cortex in the adrenal gland. The synthesis and release are controlled by the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS)¹, as well as by plasma potassium concentration², the pituitary peptide ACTH, and by the blood pressure via pressure sensitive baroreceptors in the vessel walls of nearly all large arteries of the body³. Aldosterone binds to mineralocorticoid receptors (MR) and triggers the transcription of hormone-responsive genes. In consequence, aldosterone increases the blood pressure by reabsorption of sodium and water from the distal tubules of the kidney into the blood, secretion of potassium into the urine, and elevation of circulating blood volume. Chronic overproduction and secretion of aldosterone leads to hypertension. Aldosterone activity is reduced in Addison's disease and increased in Conn's syndrome.

Measurement of aldosterone levels in serum in conjunction with plasma renin levels (aldosterone/renin-ratio; ARR) can be used to differentiate between primary and secondary aldosteronism^{4,8,9}.

| Condition | Serum Aldosterone | Plasma Renin |
|-------------------------|-------------------|--------------|
| Primary Aldosteronism | High | Low |
| Secondary Aldosteronism | High | High |

The measurement of aldosterone in concert with selective suppression and stimulation tests can be used to further differentiate primary aldosteronism into two basic types⁵:

- Primary aldosteronism caused by an adenoma of one or both adrenals.
- Primary aldosteronism caused by adrenal hyperplasia.

This differentiation is vital in the treatment and management of the disease. The adrenal adenomas respond well to surgery whereas hyperplastic disease of the adrenals is generally better managed medically⁶.

In addition, pharmacological modulation of nuclear hormone receptors is a common strategy for the treatment of cardiovascular disease⁷. Therefore, determining the effects of such treatments on the RAAS is of increasing value in evaluating the safety and efficacy of new therapeutics.

In summary, the precise and accurate measurement of serum aldosterone by enzyme immunoassay can be an important adjunct to a diagnostic laboratory battery for the differential diagnosis of hypertensive disease.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DRG Aldosterone ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.

The microtiter wells are coated with a polyclonal rabbit antibody directed towards an antigenic site of the aldosterone molecule. Endogenous aldosterone of a patient sample competes with an aldosterone-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off.

After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of aldosterone in the patient sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C - 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C - 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with anti-aldosterone antibody (polyclonal rabbit).
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 vials (lyophilized); 1.0 mL;
Concentrations: 0 – 20 – 80 – 200 – 500 – 1000 pg/mL
Conversion: 1 pg/mL corresponds to 2.77 pmol/L
See "Reagents Preparation";
Contain non-mercury preservative.
3. **Control Low & High**, 2 vials (lyophilized), 1 mL
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.
See "Reagents Preparation";
Contain non-mercury preservative.
4. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 20 mL, ready to use,
Aldosterone conjugated to horseradish peroxidase;
Contains non-mercury preservative.
5. **Substrate Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use,
Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
contains 0.5 M H₂SO₄,
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated),
see „Preparation of Reagents“.

Note: Additional *Standard 0* for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Scale paper or semi-logarithmic graph paper or software for data reduction
- **Optional:** Reagents for determination of **Aldosterone in urine** ([REF](#) EIA-5298-URIN) – **Contents:**
 - 1) **Release Reagent**, 1 vial, 3 mL, ready to use. Containing 1M HCl.
Avoid contact with *Release Reagent*. It may cause skin irritation.
 - 2) **Neutralization Buffer**, 1 vial, 3 mL, ready to use. Containing Tris buffer, pH 8.5.
 - 3) **Dilution Buffer**, 2 vials, 25 mL each, ready to use. Containing PBS.
- Optional: Plastic tubes (e.g. 0.5 - 1.5 mL) for pre-treatment of urine samples

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Standards

Reconstitute the lyophilized contents of the standard vials with 1.0 mL deionized water and let stand for at least 10 minutes. Mix several times before use.

Note: *The reconstituted standards are stable for 8 weeks at 2 °C to 8 °C.*

For longer storage freeze - only once - at -20 °C.

Controls

Reconstitute the lyophilized content of the controls with 1.0 mL deionized water and let stand for at least 10 minutes. Mix several times before use.

Note: *The reconstituted controls are stable for 8 weeks at 2 °C to 8 °C.*

For longer storage freeze - only once - at -20 °C.

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DRG has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA-, heparin- or citrate plasma) and urine can be used in this assay.

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Serum / Plasma Samples

5.1.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.1.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 4 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time (up to two months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.1.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

a) dilution 1:10: 10 µL sample + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly)

b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly).

5.2 Urine Samples

Aldosterone concentration can also be determined from urine samples. However, urine samples must be pre-treated before analysis. This will need additional reagents that are not included in this kit, but can be ordered separately (REF EIA-5298-URIN).

5.2.1 Sample Collection

First clean genital area with mild disinfectant to prevent contamination. Then collect clean-catch midstream urine in an appropriate sterile container. Directly after collection, the urine should be centrifuged for 5 - 10 minutes (e.g. at 2,000 g) to remove cellular debris. Use supernatant for analyte quantification. The supernatant may be stored for up to 8 hours at 2 °C to 8 °C prior to assaying. Specimens held for a longer time should be frozen at -20 °C. Thawed supernatant should be inverted several times prior to testing.

5.2.2 Protocol for Urine Sample Pre-treatment

1. Secure the desired number of vials (e.g. 0.5 - 1.5 mL plastic tubes; not included in this kit).
2. Dispense **25 µL** of **urine** with new disposable tips into appropriate tubes.
3. Dispense **25 µL Release Reagent** into each tube.
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate over night at 2 °C to 8 °C.
5. Add **25 µL Neutralization Reagent** to each tube and mix thoroughly.
6. Add **400 µL Dilution Buffer** to each tube and mix thoroughly
(This pre-treatment leads to a 1:19 dilution. Therefore the dilution factor 19 has to be taken into account for calculation of the final concentration of the urine sample.)
7. Transfer **50 µL of pre-treated and diluted urine samples** directly to the microtiter well and continue with step 3 of Test Procedure (Chapter 6.2).

5.2.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, an urine sample is found to contain more than the highest standard, the pre-treated and diluted urine sample can be further diluted with *Dilution Buffer* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account too.

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL pre-treated and diluted urine sample + 90 µL *Dilution Buffer* (mix thoroughly)
 (final dilution factor = 19 x 10 = 190)

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **50 µL** of each **Standard, Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells. For urine samples dispense 50 µL of the pre-treated and diluted urine samples (see chapter 5.2.2 Protocol for Urine Sample Pre-treatment, step 7).
3. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
4. Dispense **150 µL Enzyme Conjugate** into each well. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
6. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells **5 x** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well (if a plate washer is used) - or. **5 x** with **300 µL**/well for manual washing. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
7. Add **200 µL** of **Substrate Solution** to each well.
8. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
9. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
10. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader. It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using scale paper or semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4 Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the **serum / plasma samples** can be read **directly** from this standard curve. For **urine samples** the concentration read from the standard curve, has to be **multiplied** with the **dilution factor 19** (see chapter 5.2.2).
6. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 1000 pg/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account too.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

| Standard | Optical Units (450 nm) |
|-------------------------|------------------------|
| Standard 0 (0 pg/mL) | 2.11 |
| Standard 1 (20 pg/mL) | 1.90 |
| Standard 2 (80 pg/mL) | 1.55 |
| Standard 3 (200 pg/mL) | 1.15 |
| Standard 4 (500 pg/mL) | 0.76 |
| Standard 5 (1000 pg/mL) | 0.54 |

6.4 Final Calculation for Urine Samples

Calculate the 24 hours excretion for each urine sample: $\mu\text{g}/24 \text{ h} = \mu\text{g}/\text{L} \times \text{L}/24 \text{ h}$

Example:

Concentration for urine sample read from the standard curve = 500 pg/mL
 Result after correction with the dilution factor 19 = 9500 pg/mL
 $9500 \text{ pg/mL} / 1000 = 9.5 \mu\text{g}/\text{L}$

Total volume of 24 h-urine = 1.3 L (example)

$9.5 \mu\text{g}/\text{L} \times 1.3 \text{ L}/24 \text{ h} = 12.35 \mu\text{g}/24 \text{ h}$

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with **EDTA plasma samples** of apparently normal healthy adults, using the DRG Aldosterone ELISA the following values are observed:

| Healthy Adults | Valid N | Mean (pg/mL) | Median (pg/mL) | 5. Percentile (pg/mL) | 95. Percentile (pg/mL) |
|------------------|---------|--------------|----------------|-----------------------|------------------------|
| Supine position | 60 | 62.8 | 50.9 | 12.0 | 157.5 |
| Upright position | 60 | 68.8 | 52.5 | 13.3 | 231.4 |

These values are also valid for serum, heparin plasma and citrate plasma.

These results correspond well to published reference ranges ^{8,9}.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DRG Aldosterone ELISA (EIA-5298) and the DRG Renin ELISA (EIA-5125) the following **Aldosterone-Renin Ratios** were determined in plasma:

Ratio Aldosterone Renin (pg/mL / pg/mL)

| n | Mean | Median | 99 th percentile | 95 th percentile | 5 th percentile | 1 st percentile |
|----|------|--------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 89 | 8.68 | 5.30 | 49.65 | 28.06 | 0.68 | 0.45 |

These values are also valid for serum.

In a study conducted with **urine samples** of apparently normal healthy adults, using the DRG Aldosterone ELISA the following values are observed:

| n | Mean ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) | Median ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) | 5 th Percentile ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) | 95 th Percentile ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) |
|----|-------------------------------------|---------------------------------------|---|--|
| 40 | 11.34 | 9.40 | 3.55 | 23.01 |

These results correspond well to published reference ranges ⁸.

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 5.7 pg/mL – 1000 pg/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

| | |
|---|-----------|
| 3 β , 5 α Tetrahydroaldosterone: | 17.2 % |
| 3 β , 5 β Tetrahydroaldosterone: | 0.12 % |
| Prednisolone: | 0.017 % |
| Cortisol: | < 0.003 % |
| 11-Deoxycortisol: | < 0.003 % |
| Progesterone: | < 0.003 % |
| Testosterone: | < 0.002 % |
| Androstenedione: | < 0.002 % |

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DRG ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of the *Standard 0* (S0) and was found to be < 5.7 pg/mL.

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

| Sample | n | Mean (pg/mL) | CV (%) |
|---------|----|--------------|--------|
| Serum 1 | 20 | 85.1 | 9.7 |
| Serum 2 | 20 | 210.3 | 7.4 |
| Serum 3 | 20 | 532.2 | 3.9 |
| Urine 1 | 20 | 191.8 | 5.0 |
| Urine 2 | 20 | 391.3 | 5.6 |
| Urine 3 | 20 | 936.8 | 3.8 |

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

| Sample | n | Mean (pg/mL) | CV (%) |
|---------|----|--------------|--------|
| 1 | 40 | 101.0 | 9.9 |
| 2 | 40 | 315.1 | 8.6 |
| 3 | 40 | 656.8 | 9.4 |
| Urine 1 | 32 | 386.7 | 11.5 |
| Urine 2 | 32 | 444.0 | 11.1 |
| Urine 3 | 32 | 876.7 | 10.4 |

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding aldosterone solutions with known concentrations in a 1:1 ratio. The % recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100 (expected value = (endogenous aldosterone + added aldosterone) / 2; because of a 1:2 dilution of serum with spike material).

| | Serum 1 | Serum 2 | Serum 3 |
|-----------------------|---------|---------|---------|
| Concentration [pg/mL] | 82.7 | 96.1 | 167.9 |
| Average Recovery | 112.5 | 111.0 | 106.8 |
| Range of Recovery [%] | from | 108.2 | 108.9 |
| | to | 114.6 | 114.5 |

9.6 Linearity

| | Serum 1 | Serum 2 | Serum 3 | Urine 1 | Urine 2 | Urine 3 |
|-----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Concentration [pg/mL] | 600.5 | 546.2 | 672.0 | 559.0 | 645.0 | 464.0 |
| Average Recovery | 98.4 | 95.5 | 96.4 | 106.8 | 98.2 | 98.0 |
| Range of Recovery [%] | from | 95.5 | 87.8 | 86.0 | 104.5 | 87.8 |
| | to | 103.0 | 103.6 | 102.5 | 111.6 | 107.9 |

10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.125 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of aldosterone in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

11 LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient. Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid.

Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

1 EINLEITUNG

Der **DRG Aldosterone ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Aldosteron in Serum, Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) und Urin eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

1.1 Klinische Bedeutung

Das Steroidhormon Aldosteron ist ein hochwirksames Mineralkortikoid, das in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde gebildet wird. Die Synthese unterliegt der Kontrolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ¹ und wird beeinflusst durch die Kaliumkonzentration im Plasma ², durch das Peptidhormon ACTH der Hypophyse, sowie durch den Blutdruck, der über drucksensitive Rezeptoren in den Gefäßwänden nahezu aller großen Arterien des Körpers überwacht wird ³. Aldosteron bindet an Mineralkortikoid-Rezeptoren und induziert die Transkription Hormon-responsiver Gene. Als Konsequenz dieser Genexpression erhöht Aldosteron den Blutdruck, indem es die Resorption von Natrium aus den distalen Tubuli der Niere in das Blut fördert, die Ausscheidung von Kalium über den Urin vermehrt und das Blutvolumen erhöht.

Eine chronische Überproduktion von Aldosteron führt zu Bluthochdruck. Die Aktivität von Aldosteron ist bei der Addison'schen Erkrankung vermindert und beim Conn-Syndrom (primärer Hyperaldosteronismus) erhöht. Die Bestimmung von Aldosteron und aktivem Renin in Serum oder Plasma (Aldosteron/Renin-Ratio; ARR) kann zur Unterscheidung zwischen primärem und sekundärem Hyperaldosteronismus verwendet werden ^{4,8,9}.

| Erkrankung | Aldosteron | Renin |
|---------------------------------|------------|--------|
| Primärer Hyperaldosteronismus | erhöht | normal |
| Sekundärer Hyperaldosteronismus | erhöht | erhöht |

Weiterhin ermöglicht die Bestimmung von Aldosteron unter dem Einfluss spezieller dämpfender oder stimulierender Maßnahmen eine weitergehende Differenzierung des primären Hyperaldosteronismus in zwei grundlegende Krankheitstypen ⁵:

- Primärer Hyperaldosteronismus, der durch ein Adenom einer oder beider Nebennieren bedingt ist
- Primärer Hyperaldosteronismus, der durch eine Hyperplasie der Nebenniere bedingt ist

Die Unterscheidung beider Krankheitstypen ist essentiell für die weitere Behandlung der Erkrankung. Während Adenome der Nebenniere gut auf operative Maßnahmen ansprechen, kann die Hyperplasie generell besser medikamentös behandelt werden ⁶.

Im Rahmen einer Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen kommen zunehmend Medikamente zum Einsatz, die modulierend auf Hormonrezeptoren wirken ⁷. Im Rahmen eines solchen Behandlungskonzepts müssen die Auswirkungen auf das RAAS gut untersucht werden, um die Sicherheit und Wirksamkeit dieser Therapeutika sicher zu stellen.

Zusammenfassend spielt die präzise Erfassung des Aldosteron-Spiegels eine wesentliche Rolle bei der Differentialdiagnose des Bluthochdrucks.

2 TESTPRINZIP

Der DRG Aldosteron ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine Antikörper-Bindungsstelle des Aldosteron-Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem Aldosteron-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Aldosteron aus der Probe mit dem Aldosteron-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben, und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der Aldosteron-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);
Mit anti-Aldosteron-Antikörper (polyklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen (lyophilisiert), je 1 mL
Konzentrationen: 0 – 20 – 80 – 200 – 500 – 1000 pg/mL
Umrechnungsfaktor: 1 pg/mL entspricht 2,77 pmol/L
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Control Low & High** (Kontrollen), 2 Fläschchen (lyophilisiert), je 1 mL
Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 20 mL, gebrauchsfertig;
Aldosteron mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.
6. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält 0,5 M H₂SO₄,
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
7. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450 ± 10 nm Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplatten-Lesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- **Optional:** Reagenz zur Bestimmung von Aldosteron in Urin (**REF** EIA-5298-URIN) – **Inhalt:**
 - 1) **Release Reagent**, 1 Fläschchen, 3 mL, gebrauchsfertig. Enthält 1M HCl.
Kontakt mit *Release Reagent* vermeiden. Es kann zu Hautirritationen führen.
 - 2) **Neutralization Buffer**, 1 Fläschchen, 3 mL, gebrauchsfertig. Enthält Trispuffer, pH 8,5.
 - 3) **Dilution Buffer**, 2 Fläschchen, je 25 mL, gebrauchsfertig. Enthält PBS.
- Optional: Plastikröhrchen (z.B. 0.5 - 1.5 mL) zur Vorbehandlung von Urinproben

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Standards

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Standardfläschchen mit 1,0 mL destilliertem Wasser und lassen Sie die Fläschchen mindestens 10 Minuten ruhen. Vor Gebrauch die Standards mehrmals vorsichtig schütteln.

Achtung: Bei 2 °C bis 8 °C sind die rekonstituierten Standards 8 Wochen haltbar.

Für eine längere Aufbewahrung - nur einmal - bei -20 °C einfrieren.

Controls

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Fläschchen mit 1,0 mL destilliertem Wasser und lassen Sie die Fläschchen mindestens 10 Minuten ruhen. Vor Gebrauch die Kontrollen mehrmals vorsichtig schütteln.

Achtung: Bei 2 °C bis 8 °C sind die rekonstituierten Kontrollen 8 Wochen haltbar.

Für eine längere Aufbewahrung - nur einmal - bei -20 °C einfrieren.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte Wash Solution (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum, Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) oder Urin kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Serum- /Plasmaproben

5.1.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette - mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

5.1.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 4 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 2 Monaten) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren.

Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.1.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Probe + 90 µL *Standard 0* gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (gründlich mischen).

5.2 Urinproben

Die Aldosteronkonzentration kann ebenfalls in Urinproben bestimmt werden. Vor der Analyse müssen die Urinproben allerdings vorbehandelt werden. Dazu werden zusätzliche Reagenzien benötigt, die nicht im Kit enthalten sind. Diese Zusatzreagenzien können separat bestellt werden unter **REF** EIA-5298-URIN.

5.2.1 Probenentnahme

Um Kontaminationen zu vermeiden, den Genitalbereich zuerst mit einem milden Desinfektionsmittel reinigen. Mittelstrahl-Urin in einem geeigneten sterilen Gefäß sammeln.

Sofort nach Erhalt der Urinproben, sollten diese bei für 5 - 10 Minuten zentrifugiert werden (z.B. 2000 x g), um Zellreste zu entfernen. Der Überstand wird für die Messung eingesetzt.

Der Überstand kann vor Testbeginn bis zu 8 Stunden bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung sollte der Überstand eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden.

Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden.

5.2.2 Vorbehandlung der Urinproben

1. Die benötigte Anzahl der Röhren (z.B. 0.5 - 1.5 mL Plastikröhren, nicht im Kit enthalten) zur Vorbehandlung von Urinproben bereitstellen.
2. Je **25 µL Urinprobe mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Röhren geben.
3. **25 µL Release Reagent** in jedes Röhren geben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **Über Nacht** bei 2 °C - 8 °C inkubieren.
5. Je **25 µL Neutralization Reagent** in jedes Röhren geben, vorsichtig mischen.
6. Je **400 µL Dilution Buffer** in jedes Röhren geben, vorsichtig mischen.
(Diese Vorbehandlung führt zu einer 1:19-Verdünnung. Der Verdünnungsfaktor 19 muss daher bei der Berechnung der Endkonzentration einer Urinprobe berücksichtigt werden.)
7. **50 µL der vorbehandelten und verdünnten Urinprobe** direkt in die beschichtete Mikrotiterplatte **überführen** und mit Schritt 3 der Testdurchführung (Kap. 6.2) fortfahren.

5.2.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Urinprobe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann die vorbehandelten und vorverdünnten Urinprobe mit *Dilution Buffer* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration zusätzlich beachtet werden.

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µL vorbehandelte und vorverdünnte Urinprobe + 90 µL *Dilution Buffer* (gründlich mischen)
(Verdünnungsfaktor = $19 \times 10 = 190$)

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 50 µL Standard, Controls und Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben. Bei Urinproben 50 µL der vorbehandelten und verdünnten Urinproben in die Wells pipettieren (siehe Kapitel 5.5.2 Vorbehandlung der Urinproben, Schritt 7).
3. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
4. **150 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben. Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
5. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **5 x** mit **400 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen (mit automatischem Waschsystem) – oder Wells **5 x** mit **300 µL** pro Well waschen (mit manuellem Waschsystem). Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
7. **200 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
8. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
10. Die Optische Dichte bei **450 ± 10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Kontrollen und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der **Serum-/Plasmaproben** kann **direkt** von der Standardkurve abgelesen werden. Für **Urinproben** muss die aus der Standardkurve ermittelte Konzentration **mit dem Verdünnungsfaktor 19 multipliziert** werden (Siehe Kap. 5.2.2).
6. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen weiter verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration zusätzlich beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

| Standard | Optische Dichte (450 nm) |
|-------------------------|--------------------------|
| Standard 0 (0 pg/mL) | 2,11 |
| Standard 1 (20 pg/mL) | 1,90 |
| Standard 2 (80 pg/mL) | 1,55 |
| Standard 3 (200 pg/mL) | 1,15 |
| Standard 4 (500 pg/mL) | 0,76 |
| Standard 5 (1000 pg/mL) | 0,54 |

6.4 Finale Berechnung für Urinproben

Für jede Urinprobe sollte die 24-Stunden-Extraktion berechnet werden: $\mu\text{g}/24 \text{ h} = \mu\text{g}/\text{L} \times \text{L}/24 \text{ h}$

Beispiel:

aus der Standardkurve ermittelte Konzentration der Urinprobe = 500 pg/mL
 Ergebnis nach Korrektur mit den Verdünnungsfaktor 19 = 9500 pg/mL
 $9500 \text{ pg/mL} / 1000 = 9,5 \mu\text{g/L}$

Gesamtvolumen des 24-Stunden-Urins = 1,3 L (Beispiel)

$9,5 \mu\text{g/L} \times 1,3 \text{ L}/24 \text{ h} = 12,35 \mu\text{g}/24 \text{ h}$

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

In einer Studie wurden EDTA-Plasmaproben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DRG Aldosterone ELISA folgende Werte:

| Gesunde Erwachsene | N | Mittel (pg/mL) | Median (pg/mL) | 5. Perzentile (pg/mL) | 95. Perzentile (pg/mL) |
|------------------------|----|----------------|----------------|-----------------------|------------------------|
| Liegende Körperhaltung | 60 | 62,8 | 50,9 | 12,0 | 157,5 |
| Stehende Körperhaltung | 60 | 68,8 | 52,5 | 13,3 | 231,4 |

Diese Werte gelten auch für Serum, Heparin- und Zitratplasma.

Diese Werte stimmen gut überein mit publizierten Referenzbereichen^{8,9}.

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DRG Aldosterone ELISA (EIA 5298) und dem DRG Renin ELISA folgende **Aldosteron-Renin-Quotienten** in Plasma:

Aldosteron-Renin-Quotienten (pg/mL/pg/mL)

| n | Mittelwert | Median | 99. Perzentil | 95. Perzentil | 5. Perzentil | 1. Perzentil |
|----|------------|--------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| 89 | 8,68 | 5,30 | 49,65 | 28,06 | 0,68 | 0,45 |

Diese Werte gelten auch für Serum.

In einer Studie wurden die **Urinproben** von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DRG Aldosteron ELISA folgende Werte:

| n | Mittelwert ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) | Median ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) | 5. Perzentil ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) | 95. Perzentil ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) |
|----|---|---------------------------------------|---|--|
| 40 | 11,34 | 9,40 | 3,55 | 23,01 |

Diese Werte stimmen gut überein mit publizierten Referenzbereichen⁸.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 5,7 pg/mL – 1000 pg/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des *Standards 0* (n = 20), beträgt < 5,7 pg/mL.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

10 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,125 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des Aldosteron -Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DRG Aldosterone** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del Aldosterona en suero, plasma (EDTA, heparina o citrato) y urina.

Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.

2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DRG Aldosterone ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio de unión competitiva.

Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo policlonal dirigido contra un foci antigénico en la molécula Aldosterona. En las muestras de los pacientes Aldosterona compite con un conjugado Aldosterona -peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación el conjugado no unido se lava.

La cantidad de conjugado de peroxidasa unido es inversamente proporcional a la concentración de Aldosterona en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Aldosterona en la muestra del paciente.

3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluido aquí en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H₂SO₄ 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DRG Instruments GmbH.

4 COMPONENTES DEL KIT

4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-aldosterona (policlonal).
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, (Estándar), 6 viales (liofilizados), 1,0 mL; Concentraciones: 0 – 20 – 80 – 200 – 500 – 1000 pg/mL
Conversión: 1 pg/mL = to 2,77 pmol/L
Ver “Preparación de los Reactivos”;
Contiene conservante sin mercurio.
3. **Control Low & High** (Control), 2 viales, (liofilizado), 1,0 mL,
Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC.
ver “Preparación de los Reactivos”
Contiene conservante sin mercurio.
4. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 20 mL, listo para usar,
Aldosterona conjugado con la Peroxidasa de rábano;
Contiene conservante sin mercurio.
5. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 25 mL, listo para usar,
Tetrametilbencidina (TMB).
6. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar,
contiene 0.5 M H₂SO₄,
Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en al piel.
7. **Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X),
ver “Preparación de los Reactivos”.

Nota: Se puede solicitar el *Standard 0* para la dilución de la muestra.

4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ± 10 nm) (ej. DRG Instruments Microtiter Plate Reader).
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada o deionizada
- Temporizador
- Papel a escala, papel para gráficos semilogarítmicos o software de reducción de datos
- **Opcional:** Reactivos para la determinación de **Aldosterona en orina** (REF EIA-5298-URIN) – **Contenido:**
 - 1) **Release Reagent** (Reactivo de liberación), 1 vial, 3 mL, listo para usar. Contiene HCl 1M.
Evitar el contacto con el reactivo de liberación. Puede ocasionar irritación en la piel.
 - 2) **Neutralization Buffer** (Tampón de neutralización), 1 vial, 3 mL, listo para usar.
Contiene tampón Tris, pH 8,5.
 - 3) **Dilution Buffer** (Tampón de dilución), 2 viales, 25 mL cada uno, listo para usar. Contiene PBS.
- Opcional: Tubos de plástico (e.g. 0,5 - 1,5 mL) para el pretratamiento de muestras de orina

4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante dos meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Standards

Reconstituir los contenidos liofilizados de los viales de los estándares con 1,0 mL de agua destilada y dejar reposar como mínimo durante 10 minutos. Mezclar varias veces antes de usar.

Nota: Los estándares reconstituidos son estables durante 8 semanas de 2 °C - 8 °C.

Para el almacenamiento a largo plazo congelar - solo una vez - a -20 °C.

Control

Reconstituir el contenido liofilizado con 1,0 mL de agua destilada y dejar reposar como mínimo durante 10 minutos. Mezclar varias veces antes de usar.

Nota: Los controles reconstituidos son estables durante 8 semanas de 2 °C - 8 °C.

Para el almacenamiento a largo plazo congelar - solo una vez - a -20 °C.

Wash Solution

Mezclar 30 mL de Wash Solution concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL. La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.

4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DRG, no mas tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5 MUESTRAS

Suero o plasma (EDTA, heparina o citrato) y urina pueden ser usados en este ensayo.

No usar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas.

Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

5.1 Muestras de suero/ plasma

5.1.1 Toma de muestras

Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrífuga que contengan anticoagulante (Ej. Sarstedt Monovette con una preparación adecuada para el plasma) y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

5.1.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 4 días a 2 °C - 8 °C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (hasta 2 meses) han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.1.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Standard 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

a) dilución 1:10: 10 µL muestra + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente)

b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente).

5.2 Muestras de orina

La concentración de aldosterona se puede determinar también a partir de muestras de orina. Sin embargo, las muestras de orina tienen que ser pretratadas antes del análisis. Esto significaría usar reactivos que no están incluidos en este kit, pero que pueden ser encargados por separado ([REF](#) EIA-5298-URIN).

5.2.1 Recogida de muestras

Primero, lavar la zona genital con un desinfectante moderado para prevenir la contaminación. Después recoger directamente en un recipiente esterilizado la orina a la mitad de la micción. Inmediatamente tras la colecta, la orina tiene que ser centrifugada de 5 a 10 minutos (e.g. a 2000 g) para eliminar los desechos celulares. Usar sobrenadante para la cuantificación de analitos.

El sobrenadante puede almacenarse por un máximo de 8 horas de 2 °C a 8 °C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas durante más tiempo deben ser congeladas a -20 °C. El sobrenadante descongelado debe ser invertido varias veces antes de su uso.

5.2.2 Protocolo para el pretratamiento de muestras de orina

1. Asegurarse del número deseado de viales (e.g. tubos de plástico de 0,5 a 1,5 mL; no incluidos en este kit).
2. Dispensar **25 µL** de **orina** con puntas desechables nuevas en los tubos apropiados.
3. Dispensar **25 µL *Release Reagent*** (reactivo de liberación) en cada tubo.
Mezclar completamente durante 10 segundos. En este paso es importante conseguir un mezclado completo.
4. Inubar durante la noche de 2 °C a 8 °C.
5. Añadir **25 µL *Neutralization Reagent*** (reactivo de neutralización) en cada tubo y mezclar exhaustivamente.
6. Añadir **400 µL *Dilution Buffer*** (tampón de dilución) en cada tubo y mezclar exhaustivamente (Este pretratamiento da lugar a una dilución de 1:19. Por ello el factor de dilución 19 tiene que ser tomado en cuenta para calcular la concentración final de la muestra de orina.)
7. Transferir **50 µL de las muestras de orina pretratadas y diluidas** directamente al pocillo de la microplaca y continúe con el paso 3 del procedimiento del test (Capítulo 6.2).

5.2.3 Dilución de la muestra

Si en un ensayo inicial se encuentra una muestra de orina que contiene más que el mayor estándar, la muestra de orina pretratada y diluida puede diluirse otra vez con *Dilution Buffer* (tampón de dilución) y nuevamente analizada según la descripción del procedimiento del ensayo.

Para calcular las concentraciones este factor de dilución también tiene que ser tenido en cuenta.

Ejemplo:

- a) dilución 1:10: 10 µL de muestra de orina pretratada y diluida + 90 µL *Dilution Buffer*
 (mezclar exhaustivamente)
 (factor de dilución final = 19 x 10 = 190)

6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **50 µL** de cada **Standard, Control** y **muestras con puntas nuevas** en los pocillos adecuados. Para las muestras de orina, dispensar 50 µL de las muestras previamente tratadas y diluidas (véase el capítulo 5.2.2 Protocolo para el pretratamiento de la muestra de orina, paso 7).
3. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
4. Dispensar **150 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo. Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
5. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente.
6. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos. Lavar los pocillos **5 x** con **400 µL** de solución de lavado diluida por pocillo (si se usa un lavador de microplacas automático) - o **5 x** con **300 µL/pocillo** para el lavado manual. Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
Nota importante: La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!
7. Adicionar **200 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
8. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
9. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
10. Leer la OD a **450 ± 10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la **Stop Solution**.

6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Usando papel a escala o papel para gráficos semilogarítmicos, construir la curva estándar trazando la absorbancia media obtenida de cada estándar en función de su concentración, con la absorbancia en la eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las **muestras de suero/ plasma** se puede leer **directamente** de esta curva estándar. Para **muestras de orina**, la concentración leída de la curva estándar, tiene que ser **multiplicada** con el **factor de dilución 19** (ver capítulo 5.2.2).
6. La concentración de las muestras puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

| Estándar | Unidades Ópticas (450 nm) |
|-------------------------|---------------------------|
| Standard 0 (0 pg/mL) | 2,11 |
| Standard 1 (20 pg/mL) | 1,90 |
| Standard 2 (80 pg/mL) | 1,55 |
| Standard 3 (200 pg/mL) | 1,15 |
| Standard 4 (500 pg/mL) | 0,76 |
| Standard 5 (1000 pg/mL) | 0,54 |

6.4 Cálculo final para muestras de orina

Calcular las 24 horas de excreción para cada muestra de orina: $\mu\text{g}/24 \text{ h} = \mu\text{g}/\text{L} \times \text{L}/24 \text{ h}$

Por ejemplo:

Concentración de muestra de orina leída de la curva estándar = 500 pg/mL
 Resultado después de la corrección con el factor de dilución 19 = 9500 pg/mL
 $9500 \text{ pg/mL} / 1000 = 9,5 \mu\text{g}/\text{L}$

Volumen total de orina en 24 h = 1,3 L (ejemplo)

$9,5 \mu\text{g}/\text{L} \times 1,3 \text{ L}/24 \text{ h} = 12,35 \mu\text{g}/24 \text{ h}$

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio con adultos aparentemente sanos (plasma EDTA) utilizando el DRG Aldosterone ELISA se observaron los siguientes valores:

| Adultos sanos | n | Media (pg/mL) | Mediana (pg/mL) | Percentil 5 (pg/mL) | Percentil 95 (pg/mL) |
|-------------------|----|---------------|-----------------|---------------------|----------------------|
| Posición supina | 60 | 62,8 | 50,9 | 12,0 | 157,5 |
| Posición vertical | 60 | 68,8 | 52,5 | 13,3 | 231,4 |

Estos valores también son válidos para el suero, plasma heparina y plasma de citrato.

Estos resultados corresponden bien con los rangos de referencia publicados ^{8,9}.

En un estudio realizado con adultos normales aparentemente sanos, usando la ELISA de DRG Aldosterona (EIA-5298) y la ELISA de DRG Renina (EIA-5125) se determinaron en plasma las siguientes

cocientes Aldosterona-Renina:

Cociente Aldosterona-Renina (pg/mL / pg/mL)

| n | Media | Mediana | Percentil 99 | Percentil 95 | Percentil 5 | Percentil 1 |
|----|-------|---------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| 89 | 8,68 | 5,30 | 49,65 | 28,06 | 0,68 | 0,45 |

Estos valores también son válidos para el suero.

En un estudio con adultos aparentemente sanos (**muestras de orina**) utilizando el DRG Aldosterone ELISA se observaron los siguientes valores:

| n | Media ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) | Mediana ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) | Percentil 5 ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) | Percentil 95 ($\mu\text{g}/24 \text{ h}$) |
|----|--------------------------------------|--|--|---|
| 40 | 11,34 | 9,40 | 3,55 | 23,01 |

Estos resultados corresponden bien con los rangos de referencia publicados ⁸.

8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico. Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos arriba mencionado sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DRG directamente.

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 5,7 pg/mL - 1000 pg/mL

9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media menos dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del *Estándar 0* y resultó ser 5,7 pg/mL.

9.4 Precisión

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.5 Recuperación

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.6 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0.125 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 30 mg/mL) no influyen los resultados del ensayo.

10.2 Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de Aldosterona en una muestra.

10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo.

11 ASPECTOS LEGALES

11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DRG.

11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3 Responsabilidad












Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Brown RD, Strott CA, and Liddle GW. Site of stimulation of Aldosterone biosynthesis by angiotensin and potassium. *J Clin Invest.* (1972), **51** (6), 1413–8.
2. Bauer JH, Gauntner WC. Effect of potassium chloride on plasma renin activity and plasma aldosterone during sodium restriction in normal man. *Kidney Int.* (1979), **15** (3): 286–93.
3. Williams GH, Dluhy RG. Aldosterone biosynthesis. Interrelationship of regulatory factors. *Am J Med.* (1972), **53** (5), 595–605.
4. Tiu SC et al. The use of aldosterone-renin ratio as a diagnostic test for primary hyperaldosteronism and its test characteristics under different conditions of blood sampling. *J Clin Endocrinol Metab.* (2005), 90 (1), 72-8.
5. Mulatero P et al. Confirmatory tests in the diagnosis of primary aldosteronism. *Horm Metab Res.* (2010), 42 (6), 406-10.
6. Quillo AR. Primary aldosteronism: results of adrenalectomy for nonsingle adenoma. *J Am Coll Surg.* (2011), 213 (1), 106-12.
7. Grossmann C and Gekle M. New aspects of rapid aldosterone signaling. *Mol Cell Endocrinology* (2009), 308 (1-2), 53-62.
8. Thomas L (editor). Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). *Labor und Diagnose* (2005); 1406-24.
9. Perschel FH et al. Rapid Screening test for primary hyperaldosteronism: ratio of plasma aldosterone to renin concentration determined by fully automated chemiluminescence immunoassays. *Clin. Chemistry* (2004); 50 (9), 1650-55.

SYMBOLS USED

| Symbol | English | Deutsch | Italiano | Español | Français |
|---|---|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--|
|  | European Conformity | CE-Konformitätskennzeichnung | Conformità europea | Conformidad europea | Conformité normes européennes |
|  | Consult instructions for use * | Gebrauchsanweisung beachten * | Consultare le istruzioni per l'uso | Consulte las instrucciones de uso | Consulter les instructions d'utilisation |
|  | <i>In vitro</i> diagnostic medical device * | <i>In-vitro</i> -Diagnostikum * | Diagnostica in vitro | Diagnóstico in vitro | Diagnostic in vitro |
|  | Catalogue number * | Artikelnummer * | No. di Cat. | No de catálogo | Référence |
|  | Batch code * | Chargencode * | Lotto no | Número de lote | No. de lot |
|  | Contains sufficient for <n> tests * | Ausreichend für <n> Prüfungen * | Contenuto sufficiente per "n" saggi | Contenido suficiente para <n> ensayos | Contenu suffisant pour "n" tests |
|  | Temperature limit * | Temperaturbegrenzung * | Temperatura di conservazione | Temperatura de conservacion | Température de conservation |
|  | Use-by date * | Verwendbar bis * | Data di scadenza | Fecha de caducidad | Date limite d'utilisation |
|  | Manufacturer * | Hersteller * | Fabbricante | Fabricante | Fabricant |
|  | Caution * | Achtung * | | | |
| | | | | | |
|  | For research use only | Nur für Forschungszwecke | Solo a scopo di ricerca | Sólo para uso en investigación | Seulement dans le cadre de recherches |
| <i>Distributed by</i> | Distributed by | Vertreiber | Distributore | Distribuidor | Distributeur |
| <i>Content</i> | Content | Inhalt | Contenuto | Contenido | Conditionnement |
| <i>Volume/No.</i> | Volume / No. | Volumen / Anzahl | Volume / Quantità | Volumen / Número | Volume / Quantité |
| | | | | | |
| <i>Microtiterwells</i> | Microtiterwells | Mikrotiterwells | Micropozzetti | Placas multipocillo | Plaques de micro-titration |
| <i>Antiserum</i> | Antiserum | Antiserum | Antisiero | Antisero | Antisérum |
| <i>Enzyme Conjugate</i> | Enzyme Conjugate | Enzymkonjugat | Tracciante enzimatico | Conjugado enzimático | Conjugué enzymatique |
| <i>Enzyme Complex</i> | Enzyme Complex | Enzymkomplex | Complesso enzimatico | Complejo enzimático | Complexe enzymatique |
| <i>Substrate Solution</i> | Substrate Solution | Substratlösung | Soluzione di substrato | Solución de sustrato | Solution substrat |
| <i>Stop Solution</i> | Stop Solution | Stopplösung | Soluzione d'arresto | Solución de parada | Solution d'arrêt |
| <i>Zero Standard</i> | Zero Standard | Nullstandard | Standard zero | Estándar cero | Zero Standard |
| <i>Standard</i> | Standard | Standard | Standard | Estándar | Standard |
| <i>Control</i> | Control | Kontrolle | Controllo | Control | Contrôle |
| <i>Assay Buffer</i> | Assay Buffer | Assaypuffer | Tampone del test | Tampón de ensayo | Tampon d'essai |
| <i>Wash Solution</i> | Wash Solution | Waschlösung | Soluzione di lavaggio | Solución de lavado | Solution de lavage |
| <i>1N NaOH</i> | 1N NaOH | 1N NaOH | 1N NaOH (idrossido di sodio 1N) | 1N NaOH | 1N NaOH |
| <i>1 N HCl</i> | 1 N HCl | 1 N HCl | | 1 N HCl | 1N HCl |
| <i>Sample Diluent</i> | Sample Diluent | Probenverdünnungsmedium | Diluyente dei campioni | Solución para dilución de la muestra | Solution pour dilution de l'échantillon |
| <i>Conjugate Diluent</i> | Conjugate Diluent | Konjugatverdünnungsmedium | Diluyente del tracciante | Solución para dilución del conjugado | Solution pour dilution du conjugué |