



Aldosterone Elisa

KAPDB450

LOT : 110225/2



Aldosterone Elisa

en

For the direct quantitative determination of Aldosterone in human serum and urine by enzyme immunoassay.

KAPDB450

IN VITRO DIAGNOSTIC

DIASource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of Aldosterone in human serum by enzyme immunoassay. Hydrolysis is necessary for the determination of Aldosterone in urine

For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows 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 sites on the microwell plate. The washing and decanting procedures remove unbound materials. After the washing step, the enzyme substrate is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the stopping solution. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. The intensity of the colour formed is inversely proportional to the concentration of aldosterone in the sample. 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.

CLINICAL APPLICATIONS

Aldosterone is a potent mineral corticoid whose synthesis and release are controlled by the renin-angiotensin system of the body. Aldosterone promotes the reabsorption of sodium in the distal tubules of the kidney resulting in potassium secretion along with sodium retention, which controls the circulating blood volume. Chronic overproduction and secretion of aldosterone leads to hypertension.

Measurement of aldosterone levels in serum in conjunction with plasma renin levels can be used to differentiate between primary and secondary aldosteronism.

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 types:

- 1.Primary aldosteronism caused by an adenoma of one or both adrenals.
- 2.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 medically. 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.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. Control materials or serum pools should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
3. When the use of water is specified for reconstitution, use deionized or distilled water.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, gloves should be worn when handling kit reagents and human specimens.
5. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
6. A calibration curve must be established for every run.
7. The control should be included in every run and fall within established confidence limits.
8. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the control do not reflect established ranges.

9. When reading the microplate, the presence of bubbles in the microwells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.

10. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.

11. When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.

12. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, calibrator and control.

13. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.

14. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of aldosterone in human serum and urine. The kit is not calibrated for the determination of aldosterone in other specimens of human or animal origin.

2. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.

3. Any samples or control sera containing azide are not compatible with this kit, as they may lead to false results.

4. Only calibrator 0 may be used to dilute urine and any high serum samples. The use of any other reagents may lead to false results.

5. The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products if false results are suspected.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Human serum that may be used in the preparation of the calibrators and control has been tested and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen and has also been tested for the presence of antibodies to HCV and Human Immunodeficiency Virus (HIV) and found to be negative. However no test method can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any infectious agents are absent. The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide and sulfuric acid. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Serum: Approximately 0.2 ml of serum is required per duplicate determination. Collect 4-5 ml of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer. Store at 4°C for up to 24 hours or at -10°C or lower if the analyses are to be done at a later date.

Urine: Approximately 1 ml of urine is required per duplicate determination. Collect 24-hour urine into a specimen collection container. Store at 4°C for up to 24 hours or at -10°C or lower if the analyses are to be done at a later date.

Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

SERUM PRETREATMENT

No specimen pretreatment is necessary.

URINE PRETREATMENT

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

2. Pipet 1 mL of each urine sample into an appropriate tube.

* If the sample is cloudy, first centrifuge the urine and work with the supernatant.

3. Hydrolysis: Add 0.1 mL of 3.2 N HCl (not supplied) to every tube. Cap securely and heat for 1 hour at 60°C in the dark.

* 3.2 N HCl can be made by adding 1 mL of concentrated HCl (12N) to 2.75 mL distilled water.

4. Neutralization: Add 0.1 mL of 3.2 N NaOH to every tube and mix gently and thoroughly.

* 3.2 N NaOH can be made by dissolving 1.28 grams of NaOH pellets into 10 mL distilled water.

5. Dilution: Dilute the neutralized samples 1:50 with calibrator 0.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Precision pipettes to dispense 50, 100, 150 and 300 µl
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. 3.2 N HCl and 3.2 N NaOH (for urine analysis)
5. Glass or polypropylene tubes (for urine analysis)
6. Water bath (for urine analysis)
7. Plate shaker
8. Microwell plate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step10)

REAGENTS PROVIDED

ULI **Rabbit Anti-Aldosterone Antibody Coated Microwell Plate-Break Apart Wells** - Ready To Use.
 Contents: One 96 well (12x8) polyclonal antibody-coated microwell plate in a resealable pouch with desiccant.
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: 12 months or as indicated on label.

AG	HRP	CONC
----	-----	------

Aldosterone-Biotin : Avidin-Horse Radish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate – X50
 Contents: Aldosterone-biotin and avidin-HRP conjugates in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
 Volume: 300 µl/vial
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: 12 months or as indicated on label.
 Preparation: Dilute the aldosterone-biotin:avidin-HRP concentrate 1:50 in assay buffer before use. If the whole plate is to be used dilute 240 µl of HRP in 12ml of assay buffer. Discard any that is left over.

CAL	N
-----	---

Aldosterone Calibrators - Ready To Use. N = 0 to 5
 Contents: Six vials containing aldosterone in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking matrix with a defined quantity of aldosterone.
 *Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations.

Calibrator	Concentration	Volume/Vial
Calibrator 0	0 pg/ml	2.0 ml
Calibrator 1	20 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 2	80 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 3	300 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 4	800 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 5	2000 pg/ml	0.5 ml

Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the calibrators should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

CONTROL

Control - Ready To Use.
 Contents: One vial containing aldosterone in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of aldosterone. Refer to vial label for expected value and acceptable range.
 Volume: 0.5 ml/vial
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: 12 months in unopened vial or as indicated on label. Once opened, the control should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Wash Buffer Concentrate – X10
 Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.
 Volume: 50 ml/bottle
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: 12 months or as indicated on label.
 Preparation: Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole plate is to be used dilute 50 ml of the wash buffer concentrate in 450 ml of water.

ASS	BUF
-----	-----

Assay Buffer - Ready To Use.
 Contents: One vial containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
 Volume: 15 ml/vial
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: 12 months or as indicated on label.

CHROM	TMB
-------	-----

TMB Substrate - Ready To Use.
 Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.
 Volume: 16 ml/bottle
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: 12 months or as indicated on label.

STOP	SOLN
------	------

Stopping Solution - Ready To Use.
 Contents: One vial containing 1M sulfuric acid.
 Volume: 6 ml/vial
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: 12 months or as indicated on label.

ASSAY PROCEDURE
Specimen Pretreatment:
 Serum: None.
 Urine: **Hydrolysis, Neutralization and Dilution** (see detailed instructions under Urine Pretreatment)

All reagents must reach room temperature before use. Calibrators, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1. Prepare working solutions of the conjugate and wash buffer.
2. Remove the required number of microwell strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3. Pipette 50 µl of each calibrator, control and patients samples (serum or treated urine) into correspondingly labelled wells in duplicate.
4. Pipette 100 µl of the conjugate working solution into each well (We recommend using a multichannel pipette).
5. Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for 1 hour at room temperature.
6. Wash the wells 3 times with 300 µl of diluted wash buffer per well and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry (The use of a washer is recommended).
7. Pipette 150 µl of TMB substrate into each well at timed intervals.
8. Incubate on a plate shaker for 10-15 minutes at room temperature (or until calibrator 0 attains dark blue colour for desired OD).
9. Pipette 50 µl of stopping solution into each well at the same timed intervals as in step 7.
10. Read the plate on a microwell plate reader at 450 nm withing 20 minutes after addition of the stopping solution.

* If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450 nm filter is unavailable, a 405 or 415 nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.

CALCULATIONS

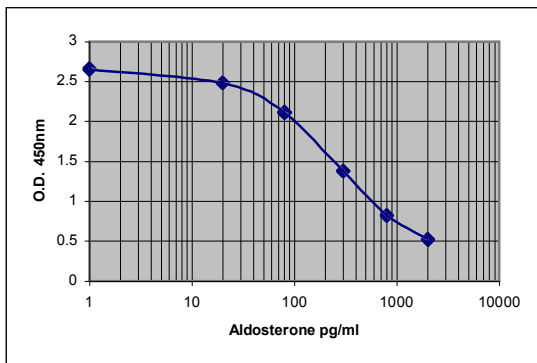
1. Calculate the mean optical density of each calibrator duplicate.
2. Draw a calibration curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the calibrator concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the serum samples directly off the calibration curve.5. If a serum sample reads more than 2000 pg/ml then dilute it with calibrator 0 at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor
5. Read the values of the urine samples directly off the curve and multiply by a factor of 60 (the original urine samples are diluted 1-in-1.2 and 1-in-50, see the urine pretreatment). Next, multiply by the volume of collected 24-hour urine (in litres). Finally, divide this figure by 1000 to obtain values in µg/24 hour If a urine sample reads more than 2000 pg/ml then dilute it with the calibrator 0 at a dilution of no more than 1:2 (from the original 1:50 dilution). The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL TABULATED DATA

Calibrator	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (pg/ml)
0	2.724	2.569	2.647	0
1	2.455	2.499	2.477	20
2	2.115	2.103	2.109	80
3	1.351	1.401	1.376	300
4	0.837	0.810	0.824	800
5	0.528	0.521	0.525	2000
Unknown	1.885	1.805	1.845	138

TYPICAL CALIBRATION CURVE

Sample curve only. Do not use to calculate results.



EXPECTED NORMAL VALUES

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values. The results of an expected range study with apparently normal healthy subjects yielded the following results (all values are reported in pg/ml):

Group:	Unrestricted salt intake, seated position
Subjects:	n = 54
Mean:	105 pg/ml
Expected Range (As central 95 percentile):	25-315 pg/ml

REFERENCE NORMAL VALUES-URINE

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.

Group	Range (µg/24 hr)
Normal Salt Intake	5-19

Wilson, J.D. and Foster, D.W. Williams Textbook of Endocrinology 8th Edition. W.B. Saunders Company, London. p 582, 1992.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The lower detection limit is calculated from the calibration curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Calibrator 0 (based on 10 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the DIAsource Direct Aldosterone ELISA kit is **15 pg/ml**.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with the Direct Aldosterone ELISA kit with aldosterone cross-reacting at 100%.

Steroid	%Cross Reactivity
Aldosterone	100
11-Deoxycorticosterone	1.1

The following steroids were tested but cross-reacted at less than 0.001%: Androsterone, Cortisone, 11-Deoxycortisol, 21-Deoxycortisol, Dihydrotestosterone, Estradiol, Estrone, Estrone and Testosterone.

INTRA-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times each on the same calibration curve. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	66.83	5.68	8.5
2	116.94	5.50	4.7
3	202.07	12.93	6.4

INTER-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times over a period of four weeks. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	75.65	6.43	8.5
2	114.62	10.09	8.8
3	180.97	15.74	8.7

RECOVERY

Spiked samples were prepared by adding defined amounts of aldosterone to three patient serum samples. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1	45.30	-	-
Unspiked	119.1	96.3	123.7
+51.0	143.8	147.2	97.6
+101.90	227.5	249.1	91.3
+203.80			
2	130.0	-	-
Unspiked	209.4	181.0	115.7
+51.0	243.1	231.9	104.8
+101.90	307.5	333.8	92.1
+203.80			
3	208.4	-	-
Unspiked	289.3	259.4	111.5
+51.0	341.6	310.3	110.1
+101.90	460.1	412.2	111.6
+203.80			

LINEARITY

Two patient serum samples were diluted with calibrator 0. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1	859.53	-	-
1:2	456.54	429.77	106.2
1:4	224.16	214.88	104.3
1:8	127.29	107.44	118.5
2	710.39	-	-
1:2	335.07	355.20	94.3
1:4	164.03	177.60	92.4
1:8	88.94	88.80	100.2
3	793.71	-	-
1:2	365.35	396.85	92.1
1:4	160.79	198.43	81.0
1:8	84.56	99.21	85.2

REFERENCES

- Varsano-Aharon, N., and Ulick, S., Further Simplifications in the Immunoassay of Plasma Aldosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 39/2:375-379, 1974.
- Himathongkam, T., et al., Potassium-Aldosterone-Renin Interrelationships. J. Clin. Endocrinol. Metab. 41/1:153-159, 1975.
- Lun, S., et al., A Direct Radioimmunoassay for Aldosterone in Plasma. Clin. Chem. 29/2:268-271, 1983.
- Cartledge, S. and Lawson, N., Aldosterone and Renin Measurements. Ann. Clin. Biochem. 37:262-278, 2000.
- Sequeira, S.J., et al., Evaluation of an Aldosterone Radioimmunoassay: The Renin-Angiotensin-Aldosterone Axis as a Function of Sex and Age. Ann. Clin. Biochem. 23:65-75, 1986.
- Stabler, T.V. and Siegel, A.L., Chemiluminescence Immunoassay of Aldosterone in Serum. Clin. Chem. 37/11:1987-1989, 1991.
- Miller, M.A., et al., Extraction Method and Nonextracted Kit Comparison for Measuring Plasma Aldosterone. Clin. Chem. 43/10:1995-1997, 1997.
- Vallotton M.B., Primary Aldosteronism. Part 1. Diagnosis of Primary Hyperaldosteronism. Clin. Endocrinol. 45:47-52, 1996.
- Oelkers, W., et al., Diagnosis, Therapy Surveillance in Addison's Disease: Rapid Adrenocorticotrophin (ACTH) Test and Measurement of Plasma ACTH, Renin Activity and Aldosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 75:259-264, 1992.
- Ad Dujaili, E.A.S. and Edwards, C.R.W., Optimization of a Direct Radioimmunoassay for Plasma Aldosterone. J. Steroid Biochem. 14:481-487, 1981.
- Corry, D.B. and Tuck, M.L., Secondary Aldosteronism. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 24:511-528, 1995.
- Check, J.H., et al, Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. Gynecol. Obstet. Invest. 40:139-140, 1995.

Revision date : 2011-02-25



Elisa Aldosterona

es

Para la determinación cuantitativa directa de aldosterona en suero humano y orina por inmunoensayo enzimático.

KAPDB450

DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

USO PREVISTO

Para la determinación cuantitativa directa de aldosterona en suero humano con un inmunoensayo enzimático. La hidrólisis es necesaria para la determinación de aldosterona en la orina.

Solo para uso de diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El principio del siguiente inmunoensayo enzimático sigue el típico patrón de unión competitiva. La competencia ocurre entre un antígeno no marcado (presente en los calibradores, control y muestras de los pacientes) y un antígeno marcado con una enzima (conjugado) por un número limitado de sitios de unión de anticuerpos en la pared de los pocillos de la microplaca. Los procedimientos de lavado y decantado eliminan el material que no se ha unido. Después del paso de lavado, se añade el sustrato de la enzima. La reacción enzimática se detiene añadiendo la solución de parada. La absorbancia se mide en un lector de microplacas. La intensidad del color formado es inversamente proporcional a la concentración de aldosterona en la muestra. Se utiliza un grupo de calibradores para dibujar una curva de calibración desde donde se puede leer directamente la cantidad de aldosterona en las muestras de los pacientes y los controles.

APLICACIONES CLÍNICAS

La aldosterona es un corticoide mineral potente cuya síntesis y liberación están controladas por el sistema renina-angiotensina del organismo. La aldosterona promueve la reabsorción de sodio e los túbulos distales del riñón resultando en la secreción de potasio junto con la retención de sodio, que controla el volumen sanguíneo circulante. La sobreproducción y secreción crónica conduce a la hipertensión.

La medición de los niveles de aldosterona en suero, en conjunto con los niveles plasmáticos de la renina se pueden utilizar para diferenciar entre aldosteronismo primario y secundario.

Enfermedad	Aldosterona sérica	Renina plasmática
Aldosteronismo primario	Alta	Baja
Aldosteronismo secundario	Alta	Alta

La medición de la aldosterona en conjunto con pruebas de estimulación de supresión selectivas se puede utilizar para diferenciar aún más el aldosteronismo en dos tipos básicos:

1. Aldosteronismo primario causado por un adenoma de una o ambas suprarrenales.
2. Aldosteronismo primario causado por hiperplasia suprarrenal.

Esta diferenciación es fundamental para el tratamiento y manejo de la enfermedad. Los adenomas suprarrenales responden bien a la cirugía, mientras que la enfermedad hiperplásica de las suprarrenales, en general es manejada mejor en forma médica. En resumen, la medición precisa y exacta de la aldosterona sérica por inmunoensayo enzimático puede ser un aporte importante a una batería de pruebas diagnósticas de laboratorio para el diagnóstico diferencial de la enfermedad hipertensiva.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Los usuarios deben adquirir una comprensión a fondo de este protocolo para la utilización exitosa de este kit. Solo se obtendrá un rendimiento confiable si se adhiere estricta y cuidadosamente a las instrucciones suministradas.
2. Se deben incluir materiales de control o combinaciones de sueros en cada serie en concentraciones altas y bajas para comprobar la confiabilidad de los resultados.
3. Cuando se especifica el uso de agua para diluir o reconstituir, utilizar agua desionizada o destilada.
4. Para reducir la exposición a sustancias potencialmente dañinas, se deben usar guantes al manipular los reactivos del kit y las muestras humanas.
5. Todos los reactivos del kit y las muestras deben estar a temperatura ambiente y deben mezclarse suavemente pero completamente antes de utilizar. Evitar congelar y descongelar repetidamente los reactivos y las muestras.
6. Se debe crear una curva de calibración para cada serie.

7. Se debe incluir un control en cada serie y debe estar entre los límites de confianza establecidos.
8. Procedimientos técnicos inadecuados, pipeteo impreciso, lavado incompleto así como almacenaje inadecuado de los reactivos pueden ser la causa de que los valores del ensayo para el control no reflejen los rangos establecidos.
9. Al leer la microplaca, la presencia de burbujas afectará la densidad óptica (DO). Remover cuidadosamente todas las burbujas antes de realizar la lectura.
10. La solución del sustrato (TMB) es sensible a la luz y debe permanecer incolora si se almacena adecuadamente. El desarrollo de un color azul puede indicar inestabilidad o contaminación, en cuyo caso no debe utilizarse.
11. Al dispensar el sustrato y la solución de parada, no utilizar pipetas en las que estos líquidos tomen contacto con partes metálicas.
12. Para prevenir la contaminación de los reactivos, utilizar una punta de pipeta nueva desechable para dispensar cada reactivo, muestra, calibrador y control.
13. No mezclar los componentes del kit con números de lote diferentes en una prueba y no utilizar ningún componente pasada su fecha de caducidad impresa en la etiqueta.
14. Los reactivos del kit deben considerarse como desechos peligrosos y deben eliminarse según las directrices nacionales.

LIMITACIONES

1. Todos los reactivos en el kit están calibrados para la determinación directa de aldosterona en suero humano y orina. El kit no está calibrado para la determinación de aldosterona en otras muestras de origen humano o animal.
2. No utilizar suero excesivamente hemolizado, excesivamente lipémico, icterico o almacenado en forma inadecuada.
3. Cualquier muestra o suero de control que contenga azida, no es compatible con este kit, ya que pueden producir resultados falsos..
4. Para diluir cualquier muestra de orina o suero de alta concentración, solo utilizar el calibrador 0. La utilización de cualquier otro reactivo puede producir resultados falsos..
5. Nunca se deben utilizar los resultados obtenidos con este kit, como la única base para un diagnóstico clínico. Por ejemplo, la ocurrencia de anticuerpos heterófilos en pacientes que habitualmente están expuestos a animales o productos animales, potencialmente pueden causar interferencias en pruebas inmunológicas. Por lo tanto, el diagnóstico clínico debe incluir todos los aspectos de los antecedentes de un paciente incluyendo la frecuencia de la exposición a animales / productos si se sospecha que hay resultados falsos.

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD Y ADVERTENCIAS SOBRE MATERIAL POTENCIALMENTE BIOPELIGROSO

El suero humano que puede haberse utilizado en la preparación de los calibradores y control, ha sido analizado y ha resultado no reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B, asimismo ha sido analizado para la presencia de anticuerpos anti VHC y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y ha resultado negativo. Sin embargo, ningún método ofrece una seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHC y hepatitis B o de ningún otro agente infeccioso. Los reactivos deben considerarse como potencialmente biopeligrosos y deben manipularse con las mismas precauciones aplicadas a cualquier muestra de sangre.

PELIGROS QUÍMICOS

Evitar el contacto con reactivos que contienen TMB, peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico. Si se produce contacto con cualquiera de estos reactivos, lavar con abundante agua. Se sospecha que TMB es carcinogénico..

TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAJE

Suero: Se necesita aproximadamente 0,2 ml de suero por cada determinación en duplicado. Extraer 4-5 ml de sangre en un tubo debidamente etiquetado y dejar que coagule. Centrifugar y extraer cuidadosamente el suero sobrenadante. Almacenar a 4°C hasta por 24 horas o a -10°C o menos si el análisis se realizará más adelante

Orina: Se necesita aproximadamente 1 ml de orina por determinación en duplicado. Recolectar la orina de 24 horas en un recipiente recolector de muestra. Almacenar a 4°C hasta por 24 horas o a -10°C o menos si el análisis se realizará más adelante.

Considerar todas las muestras humanas como posible material biopeligroso y tomar las medidas adecuadas al manipularlas.

TRATAMIENTO PREVIO DEL SUERO

No es necesario el tratamiento previo de las muestras.

TRATAMIENTO PREVIO DE LA ORINA

1. Etiquetar un tubo de vidrio o polipropileno para cada muestra de orina.
2. Pipetear 1 ml de cada muestra de orina en el tubo correspondiente.
* Si la muestra está turbia, primero centrifugar la orina y trabajar con el sobrenadante.
3. Hidrólisis: Añadir 0,1 ml de HCl 3,2 N (no suministrado) en cada tubo. Tapar firmemente e incubar por 1 hora a 60°C en la oscuridad.
* Se puede preparar HCl 3,2 N añadiendo 1 ml de HCl concentrado (12N) a 2,75 ml de agua destilada.
4. Neutralización: Añadir 0,1 ml de NaOH 3,2 N a cada tubo y mezclar suavemente pero completamente.
* Se puede preparar NaOH 3,2 N disolviendo 1,28 gramos de gránulos de NaOH en 10 ml de agua destilada.
5. Dilución: Diluir las muestras neutralizadas 1:50 con el calibrador 0.

REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

1. Pipetas de precisión para dispensar 50, 100, 150 y 300 µl
2. Puntas de pipetas desechables
3. Agua destilada o desionizada
4. HCl 3,2 N y NaOH 3,2 N (para análisis de orina)
5. Tubos de vidrio o polipropileno (para análisis de orina)
6. Baño maría (para análisis de orina)
7. Agitador de microplacas.
8. Lector de microplacas con un filtro a 450 nm y límite superior de DO de 3,0 o mayor* (ver procedimiento del ensayo paso 10).

REACTIVOS SUMINISTRADOS

ULU Microplaca con pocillos desprendibles recubiertos con anticuerpos anti aldosterona de conejo - Listos para usar.

Contenido: Una microplaca de 96 pocillos (12x8) recubiertos con anticuerpos policlonales en una bolsa re sellable don desecante.
Almacenaje: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

AG	HRP	CONC
----	-----	------

Aldosterona-Biotina : Conjugado de Avidina-Peroxidasa se rábano picante (HRP) concentrado - X50

Contenido: Conjugados de Aldosterona-biotina y avidina-HRP en un tampón en base proteica con un conservante sin mercurio.
Volumen: 300 µl/vial
Almacenaje: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.
Preparación: Diluir el concentrado aldosterona-biotina:avidina-HRP 1:50 en el tampón del ensayo antes de utilizar. Si va a utilizar toda la microplaca, diluir 240 µl de HRP en 12 ml de tampón del ensayo. Eliminar cualquier remanente.

CAL	N
-----	---

Calibradores Aldosterona - Listo para usar. N = 0 a 5

Contenido: Seis viales con un tampón en base proteica con un conservante sin mercurio. Preparado añadiendo una cantidad definida de aldosterona.
*En la lista a continuación están las concentraciones aproximadas, ver las etiquetas en los viales para concentraciones exactas.

Calibrador	Concentración	Volumen/Vial
Calibrador 0	0 pg/ml	2,0 ml
Calibrador 1	20 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 2	80 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 3	300 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 4	800 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 5	2000 pg/ml	0,5 ml

Almacenaje: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses en viales sellados o según lo indicado en la etiqueta. Una vez abiertos, los calibradores deben utilizarse dentro de 14 días o alícuotados y almacenados congelados. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.

CONTROL

Control - Listo para usar.

Contenido: Un vial con aldosterona en un tampón en base proteica con un conservante sin mercurio. Preparado añadiendo una cantidad definida de aldosterona. Ver la etiqueta del vial para valor esperado y rango aceptable.
Volumen: 0,5 ml/vial
Almacenaje: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses en viales sellados o según lo indicado en la etiqueta. Una vez abiertos, el control debe utilizarse dentro de 14 días o alícuotado y almacenado congelado. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Tampón de lavado concentrado - X10

Contenido: Una botella con tampón con detergente no iónico y conservante sin mercurio.
Volumen: 50 ml/botella
Almacenaje: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.
Preparación: Diluir 1:10 en agua destilada antes de utilizar. Si va a utilizar toda la microplaca, diluir 50 ml del tampón de lavado concentrado en 450 ml de agua destilada

ASS	BUF
-----	-----

Tampón del ensayo - Listo para usar.

Contenido: Un vial con tampón en base proteica con un conservante sin mercurio.
Volumen: 15 ml/vial
Almacenaje: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

CHROM	TMB
-------	-----

Sustrato TMB - Listo para usar.

Contenido: Una botella con tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en un tampón sin DMF o DMSO.
Volumen: 16 ml/botella
Almacenaje: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

STOP	SOLN
------	------

Solución de parada - Listo para usar.

Contenido: Un vial con ácido sulfúrico 1M.
Volumen: 6 ml/vial
Almacenaje: Refrigerar a 2-8 °C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Tratamiento previo de la muestra:

Suero: No.
Orina: **Hidrólisis, Neutralización y Dilución** (ver instrucciones detalladas en *Tratamiento previo de la orina*)

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de utilizarlos. Los calibradores, controles y muestras deben analizarse en duplicado. Una vez que el procedimiento se ha iniciado, se deben completar todos los pasos sin interrupción.

1. Preparar las soluciones de trabajo para el conjugado y tampón de lavado..
2. Sacar el número necesario de tiras de microplacas. Volver a sellar la bolsa y almacenar las tiras no utilizadas en refrigeración.
3. Pipetear 50 µl de cada calibrador, control y muestras de los pacientes (u orina tratada) en los pocillos correspondientes etiquetados en duplicado.
4. Pipetear 100 µl de la solución de trabajo del conjugado en cada pocillo (se recomienda utilizar una pipeta multi canal).
5. Incubar en un agitador de placas(aproximadamente 200 rpm) por 1 hora a temperatura ambiente.
6. Lavar los pocillos 3 veces con 300 µl de tampón de lavado diluido por pocillo y golpear la placa con firmeza contra un papel absorbente para asegurar que esté seca (se recomienda utilizar una lavadora).
7. Pipetear 150 µl de sustrato TMB en cada pocillo a intervalos regulares.
8. Incubar en un agitador de placas por 10-15 minutos a temperatura ambiente (o hasta que el calibrador 0 adquiera un color azul oscuro para la DO deseada).
9. Pipetear 50 µl de solución de parada en cada pocillo a los mismos intervalos regulares utilizados en el paso 7.
10. Leer la placa en un lector de placas a 450 nm dentro de 20 minutos después de añadir la solución de parada.

* Si la DO sobrepasa el nivel superior de detección o si no hay un filtro de 450 nm disponible, se puede sustituir por uno de 405 o 415 nm. Las densidades ópticas serán más bajas, sin embargo, esto no afectará los resultados de las muestras de los pacientes/control.

CÁLCULOS

1. Calcular la densidad óptica promedio de cada calibrador en duplicado.
2. Dibujar una curva de calibración en papel semi log con las densidades ópticas promedio en el eje Y y las concentraciones de los calibradores en el eje X. Si se utiliza software para inmunoensayo, se recomienda una curva de 4 parámetros.

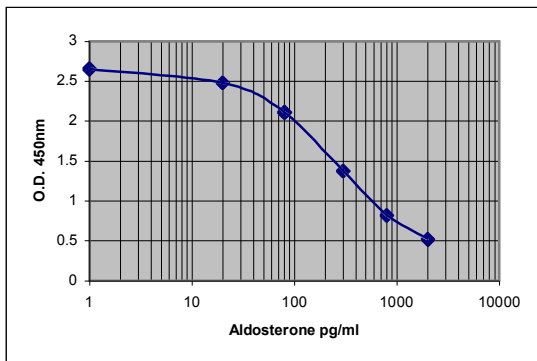
- Calcular la densidad óptica promedio de cada duplicado de las muestras desconocidas
- Leer los valores de las muestras desconocidas directamente de la curva de calibración.
- Si la lectura de la muestra resulta más de 2000 pg/ml diluir la muestra con calibrador 0 a una dilución no mayor de 1:8. El resultado obtenido debe multiplicarse por el factor de dilución.
- Leer los valores de las muestras de orina directamente de la curva y multiplicar por un factor de 60 (las muestras de orina originales se diluyen 1 en 1,2 y 1 en 50, ver tratamiento previo de orina). A continuación multiplicar por el volumen de orina reunida en 24 horas (en litros). finalmente dividir este número por 1000 para obtener los valores en $\mu\text{g}/24$ horas. Si una muestra de orina resulta mayor de 2000 pg/ml, diluir con el calibrador 0 a una dilución no mayor de 1:2 (de la dilución original de 1:50). El resultado obtenido debe multiplicarse por el factor de dilución.

DATOS TÍPICOS EN UNA TABLA

Calibrador	DO 1	DO 2	DO promedio	Valor ($\mu\text{g}/\text{dl}$)
0	2,724	2,569	2,647	0
1	2,455	2,499	2,477	20
2	2,115	2,103	2,109	80
3	1,351	1,401	1,376	300
4	0,837	0,810	0,824	800
5	0,528	0,521	0,525	2000
Desconocidos	1,885	1,805	1,845	138

CURVA DE CALIBRACIÓN TÍPICA

Curva de ejemplo solamente. **No utilizar** para calcular resultados.



VALORES NORMALES ESPERADOS

Como en todos los ensayos clínicos, cada laboratorio debe reunir datos y establecer su propio rango de valores normales esperados. Los resultados de un estudio del rango esperado con sujetos aparentemente normales y sanos dieron los siguientes resultados (todos los valores informados en pg/ml):

Grupo:	Ingestión de sal ilimitada, posición sentado
Sujetos:	n = 54
Promedio:	105 pg/ml
Rango esperado (Percentil 95 central):	25-315 pg/ml

REFERENCIA VALOR NORMAL-ORINA

Como en todos los ensayos clínicos, cada laboratorio debe reunir datos y establecer su propio rango de valores normales esperados.

Grupo	Rango ($\mu\text{g}/24$ hr)
Ingesta normal de sal	5-19

Wilson, J.D. and Foster, D.W. Williams Textbook of Endocrinology 8th Edition. W.B. Saunders Company, London. p 582, 1992.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO SENSIBILIDAD

El límite de detección mínimo se calcula a partir de la curva de calibración determinando la concentración resultante de la DO promedio del calibrador 0 (basado en 10 análisis repetidos) menos 2 SD. Por lo tanto la sensibilidad del kit DIAsource Direct Aldosterone ELISA es de **15 pg/ml**.

ESPECIFICIDAD (REACCIÓN CRUZADA)

Los siguientes compuestos fueron analizados para comprobar reactividad cruzada con el kit Direct Aldosterone ELISA con aldosterona con reacción cruzada al 100%.

Esteroides	%Reactividad cruzada
Aldosterona	100
11-Desoxicorticosterona	1,1

Los siguientes esteroides se analizaron pero la reacción cruzada fue menos de 0,001%: Androsterona, Cortisona, 11-Desoxicortisol, 21-Desoxicortisol, Dihidrotestosterona, Estradiol, Estriol, Estrona y Testosterona.

PRECISIÓN INTRA ENSAYO

Se analizaron tres muestras 10 veces cada una con la misma curva de calibración. Los resultados (en pg/ml) están en la tabla a continuación:

Muestra	Promedio	SD	CV%
1	66,83	5,68	8,5
2	116,94	5,50	4,7
3	202,07	12,93	6,4

PRECISIÓN ENTRE ENSAYOS

Se analizaron tres muestras 10 veces en un lapso de cuatro semanas. Los resultados (en pg/ml) están en la tabla a continuación:

Muestra	Promedio	SD	CV%
1	75,65	6,43	8,5
2	114,62	10,09	8,8
3	180,97	15,74	8,7

RECUPERACIÓN

Se prepararon muestras añadiendo cantidades definidas de aldosterona a muestras de suero de tres pacientes. Los resultados (en pg/ml) están en la tabla a continuación:

Muestra	Resultados observados	Resultados esperados	Recuperación%
1 Sin añadido	45,30	-	-
+51,0	119,1	96,3	123,7
+101,90	143,8	147,2	97,6
+203,80	227,5	249,1	91,3
2 Sin añadido	130,0	-	-
+51,0	209,4	181,0	115,7
+101,90	243,1	231,9	104,8
+203,80	307,5	333,8	92,1
3 Sin añadido	208,4	-	-
+51,0	289,3	259,4	111,5
+101,90	341,6	310,3	110,1
+203,80	460,1	412,2	111,6

LINEALIDAD

Suero de dos pacientes. Las muestras se diluyeron con el calibrador 0. Los resultados (en pg/ml) están en la tabla a continuación:

Muestra	Resultados observados	Resultados esperados	Recuperación%
1	859,53	-	-
1:2	456,54	429,77	106,2
1:4	224,16	214,88	104,3
1:8	127,29	107,44	118,5
2	710,39	-	-
1:2	335,07	355,20	94,3
1:4	164,03	177,60	92,4
1:8	88,94	88,80	100,2
3	793,71	-	-
1:2	365,35	396,85	92,1
1:4	160,79	198,43	81,0
1:8	84,56	99,21	85,2

REFERENCIAS

- Varsano-Aharon, N., and Ulick, S., Further Simplifications in the Immunoassay of Plasma Aldosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 39/2:375-379, 1974.
- Himathongkam, T., et al., Potassium-Aldosterone-Renin Interrelationships. J. Clin. Endocrinol. Metab. 41/1:153-159, 1975.
- Lun, S., et al., A Direct Radioimmunoassay for Aldosterone in Plasma. Clin. Chem. 29/2:268-271, 1983.
- Cartledge, S. and Lawson, N., Aldosterone and Renin Measurements. Ann. Clin. Biochem. 37:262-278, 2000.
- Sequeira, S.J., et al., Evaluation of an Aldosterone Radioimmunoassay: The Renin-Angiotensin-Aldosterone Axis as a Function of Sex and Age. Ann. Clin. Biochem. 23:65-75, 1986.
- Stabler, T.V. and Siegel, A.L., Chemiluminescence Immunoassay of Aldosterone in Serum. Clin. Chem. 37/11:1987-1989, 1991.
- Miller, M.A., et al., Extraction Method and Nonextracted Kit Comparison for Measuring Plasma Aldosterone. Clin. Chem. 43/10:1995-1997, 1997.

8. Valloton M.B., Primary Aldosteronism. Part 1. Diagnosis of PrimaryHyperaldosteronism. Clin. Endocrinol. 45:47-52, 1996.
9. Oelkers, W., et al., Diagnosis, Therapy Surveillance in Addison's Disease: Rapid Adrenocorticotrophin (ACTH) Test and Measurement of Plasma ACTH, Renin Activity and Aldosterone. J. Clin. Endocrinol. Metab. 75:259-264, 1992.
10. Ad Dujaili, E.A.S, and Edwards, C.R.W., Optimization of a Direct Radioimmunoassay for Plasma Aldosterone. J. Steroid Biochem. 14:481-487, 1981.
11. Corry, D.B, and Tuck, M.L., Secondary Aldosteronism. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 24:511-528, 1995.
12. Check, J.H., et al, Falsely Elevated Steroidal Assay Levels Related to Heterophile Antibodies Against Various Animal Species. Gynecol. Obstet. Invest. 40:139-140, 1995.

Fecha de revisión: 2011-02-25

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
µT	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor
TRAY	Incubation trays
PMSF	PMSF solution
	Protect from light
STRIP	Dot Strip
SUB	Substrate
EXTR SOLN CONC	Extraction Buffer Concentrate
CART	Cartridge
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Wash buffer

	Símbolos utilizados
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
IV D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Sílica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
MLI	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación
DIST	Distribuidor
TRAY	Bandejas de incubación
PMSF	Solución de PMSF
	Proteger de la luz
STRIP	Tries Dot
SUB	Sustrato
EXTR SOLN CONC	Concentrado de tampón de extracción
CART	Cartucho
SAV HRP	Estreptavidina HRP
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Tampón de lavado