



DCM053-13

Ed. 03/2024

ALDOSTERONE ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica dell'aldosterone in siero umano, urina o plasma umano.

IVD



LOT

Vedere l'etichetta esterna

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ test

REF DKO053

1. SCOPO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro*

Per uso professionale in laboratorio

Aldosterone ELISA è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione quantitativa dell'aldosterone nel siero, nell'urina o nel plasma umano da una popolazione adulta. I risultati devono essere impiegati in associazione ad altri dati clinici e di laboratorio come ausilio nella diagnosi dei disturbi correlati all'ipertensione.

2. RILEVANZA CLINICA

L'aldosterone è un ormone steroideo prodotto dalla zona glomerulosa della corteccia surrenale nella ghiandola surrenale. Svolge un ruolo principale nella regolazione dell'equilibrio di sodio e potassio nel sangue¹. La secrezione di aldosterone è stimolata principalmente tramite il sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS). La produzione di renina è stimolata quando è presente una riduzione della pressione di perfusione renale, una riduzione nel volume del plasma e un equilibrio di sodio negativo. La renina converte l'angiotensinogeno in angiotensina I, che comporta la produzione di angiotensina II tramite l'enzima di conversione dell'angiotensina². L'angiotensina II agisce sul sistema vascolare provocando una vasocostrizione e stimolando la secrezione di aldosterone dalla corteccia surrenale. L'aldosterone agisce sui recettori dei mineralcorticoidi all'interno delle cellule principali del tubulo distale per incrementare il riassorbimento di sodio e cloruro e ridurre il riassorbimento di potassio e idrogeno. Le misurazioni di aldosterone sono utilizzate nella diagnosi e nel trattamento di aldosteronismo primario^{3,4} (un disturbo causato dall'eccessiva secrezione di aldosterone dalla ghiandola surrenale), ipertensione causata da aldosteronismo primario, iperaldosteronismo selettivo, stati edematosi e altre condizioni di equilibrio elettrolitico.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Aldosterone ELISA è un dosaggio immunometrico enzimatico competitivo (ELISA) in cui l'aldosterone (antigene) nel campione compete con l'aldosterone antigenico coniugato con perossidasi di rafano (HRP) per il legame al numero limitato di anticorpi anti-aldosterone rivestiti sulla micropiastra (fase solida).

Dopo l'incubazione, la separazione del legato dal libero viene eseguita con un semplice lavaggio della fase solida. Quindi, l'enzima HRP nella parte libera reagisce con il substrato (H_2O_2) e il substrato TMB, e sviluppa un colore blu che cambia in giallo quando viene aggiunta la soluzione di arresto (H_2SO_4). L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di aldosterone nel campione.

La concentrazione di aldosterone nel campione viene calcolata attraverso una curva di calibrazione.

4. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

4.1. Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibratori (6 fiale, 1 mL ciascuna)

Contiene ProClin > 0,0015% e BSA

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

2. Controlli (2 fiale, 1 mL ciascuna)

Contiene ProClin > 0,0015% e BSA

Controllo A	REF DCE045/5303A-0
Controllo B	REF DCE045/5303B-0

La concentrazione del controllo è indicata sul certificato di analisi

3. Coniugato (1 fiala, 15 mL)

Aldosterone coniugato con perossidasi di rafano (HRP).

Contiene ProClin < 0,0015% e BSA

REF DCE002/5302-0

4. Micropiastra rivestita (1 micropiastra frangibile)

Micropiastra rivestita con anticorpo anti-aldosterone

REF DCE002/5303-0

5. Substrato TMB (1 fiala, 15 mL)

 H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare qualsiasi contatto con la pelle)

REF DCE004-0

6. Soluzione di arresto (1 fiala, 15 mL)

Acido solforico 0,15 mol/L (evitare qualsiasi contatto con la pelle)

REF DCE005-0

7. Soluzione di lavaggio conc. 10X (1 fiala, 50 mL)

Contiene ProClin > 0,0015%

Tampone fosfato 0,2 M pH 7,4

REF DCE054-0

4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

Tampone PBS pH 7.4

Tampone TRIS 1M pH 8.5

4.3. Materiali e strumentazione ausiliari

Provette in polipropilene (per campioni di urina)

Erogatore automatico

Pipette di precisione

Letture di micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
- Il materiale di origine animale utilizzato nella preparazione del kit è stato ottenuto da animali certificati come sani e la proteina bovina è stata ottenuta da Paesi non infettati dalla BSE, ma tali materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di ProClin™ 300 come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Attenzione

Contiene: ProClin 300

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Il substrato TMB contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito per via cutanea. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con pelle e occhi.
- La soluzione di arresto consiste in una soluzione diluita di acido solforico. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire ustioni chimiche, evitare il contatto con pelle e occhi.

- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

6. PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2-8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente convalidato per il suo utilizzo/scopo previsto.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, itterici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- Quando si pipettano i reagenti del test, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare nuovi puntali monouso per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2-8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, il kit è stabile a 2-8 °C per 6 mesi*.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

* i dati sulla stabilità in uso supportano la stabilità del reagente se usato due volte entro questo periodo di tempo.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastre rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere eseguito utilizzando campioni di siero (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o di plasma (litio eparina, sodio eparina o EDTA di potassio) o campioni di urina.

Conservazione dei campioni	Durata
2-8 °C (siero, plasma e urina)	96 ora
Cicli di congelamento/ scongelo (siero, plasma e urina)	3 cicli
-20 °C (plasma e urina)	12 mesi

9. PROCEDURA

9.1. Preparazione di calibratori e controlli

I calibratori sono pronti per l'uso e hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	40	80	300	800	1260

Miscelare delicatamente in un miscelatore a rotazione per almeno 5 minuti prima dell'uso.

I controlli sono pronti per l'uso.

9.2. Preparazione del coniugato

Pronto all'uso. Miscelare delicatamente per 5 minuti in un mixer a rotazione.

9.3. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Soluzione di lavaggio conc. 10X" con acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:10.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura

anche di trasferire completamente i cristalli sciogliendo il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

9.4. Preparazione dei campioni

La determinazione dell'aldosterone può essere effettuata su campioni di siero umano (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o plasma (litio eparina, sodio eparina EDTA di potassio) o campioni di urina. Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione.

9.4.1. Campioni di siero o plasma

Per i campioni di siero o plasma, vedere la sezione 9.5

9.4.2. Campioni di urina

Per ottenere i campioni di urina, attenersi alla seguente procedura:

- Pipettare 25 µL del campione di urina in una provetta in polipropilene
- Aggiungere 25 µL di 1M HCl a ogni provetta e miscelare accuratamente
- Chiudere con il tappo e incubare a 2-8 °C per 24 h al buio
- Aggiungere 25 µL di TRIS pH 8,5 a ogni provetta e miscelare accuratamente
- Aggiungere 400 µL di tampone in PBS
- Utilizzare 50 µL di questa soluzione per eseguire il dosaggio, come indicato nella sezione 9.5

Nota: questo pre-trattamento determina una diluizione 1:19. Considerare il fattore di diluizione 19 per il calcolo della concentrazione finale del campione di urina. Vedere la sezione 11

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione.

9.5. Procedura

- Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti. Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2-8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere conservate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2-8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati della prova, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campioni/ Controllo	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	50 µL		
Campioni/ Controlli		50 µL	

Incubare a 22 – 28 °C per 30 minuti.

Coniugato	100 µL	100 µL	
-----------	--------	--------	--

Incubare a 22 – 28 °C per 1 ora.

Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.

Nota importante: durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente.

Lavatore automatico: se si utilizzano apparecchiature automatiche, lavare i pozzetti almeno 5 volte.

Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Incubare a 22 – 28 °C per 20 minuti al buio.

Soluzione di arresto	100 µL	100 µL	100 µL
----------------------	--------	--------	--------

Agitare delicatamente la micropiastra.
Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm tramite il confronto con una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o con il bianco entro 5 minuti.

10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DiaMetra raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e % CV. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi⁵.

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. È necessario un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) **che includa il calibratore 0**.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

Affinché i risultati del test siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.

Interpolare i valori dei campioni nella curva di calibrazione per ottenere i relativi valori di concentrazione espressi in pg/mL.

Conversione delle unità:

pg/mL / 10 = ng/dL

pg/mL x 2,774 = pmol/L

Per i campioni di urina la concentrazione in pg/mL risultante dalla curva di calibrazione deve essere moltiplicata per il **fattore di diluizione 19**.

Per convertire la concentrazione di aldosterone in "mcg aldosterone/24 h" (µg aldosterone/24 h), calcolare come sopra e correggere per il volume totale di urina raccolto in 24 ore:

$$\frac{\text{pg/mL} \times \text{Vol (mL) urina in 24 ore}}{1.000.000} = \text{mcg aldosterone/24 ore}$$

12. INTERVALLO DI MISURAZIONE

L'intervallo di misurazione del test (AMR) nei campioni di plasma è 28,0 – 1260 pg/mL.

Qualsiasi valore inferiore a 28,0 pg/mL deve essere indicato come "< 28,0 pg/mL". Qualsiasi valore superiore a 1260 pg/mL deve essere indicato come "> 1260 pg/mL".

L'intervallo di misurazione del test (AMR) nei campioni di urina è 38,3 – 1260 pg/mL.

Qualsiasi valore inferiore a 38,3 pg/mL deve essere indicato come "< 38,3 pg/mL". Qualsiasi valore superiore a 1260 pg/mL deve essere indicato come "> 1260 pg/mL".

13. METROLOGIA E TRACCIABILITÀ

Il test Aldosterone ELISA è stato standardizzato in base a standard di riferimento interni, il cui valore è stato assegnato utilizzando lo spettrometro di massa a diluizione isotopica (ID/GC/MS) DGKC.

14. Incertezza di misura

L'incertezza associata alla misurazione dei calibratori del test (C₀-C₅) è stata determinata secondo CLSI EP29-A "Expression of Measurement Uncertainty in Laboratory Medicine; Approved Guideline". L'incertezza per ciascun livello di calibratore è stata valutata per un minimo di 5 giorni (1 corsa al giorno) da 3 operatori diversi. Risultato relativo a un lotto rappresentativo:

Calibratore	Conc. media (nmol/L)	95% CI (pg/mL)		Incertezza del calibratore (pg/mL)
CAL0	<LoB	N/A		N/A
CAL1	39,6	28,2	51,0	4,6
CAL2	84,3	64,1	104,5	6,0
CAL3	299,0	212,6	385,3	23,0
CAL4	792,2	737,9	846,4	43,9
CAL5	1271,4	1103,1	1439,7	37,0

15. VALORI ATTESI

I seguenti intervalli sono stati determinati utilizzando il test Aldosterone ELISA e sono forniti unicamente a scopo informativo. Il 95% degli intervalli di riferimento per adulti apparentemente sani è stato calcolato attraverso un metodo non parametrico secondo le linee guida tratte dal documento CLSI C28-A3 "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

	n	Mediana	Intervallo normale
Campioni di plasma (pg/mL)			
Posizione eretta	60	37,4	<28,0 – 221,8
Posizione supina	60	45,5	<28,0 – 141,5
Campioni di urina (mcg/24 hr)	120	10,5	3,4 – 23,2

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

16. CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

16.1. Capacità di rilevamento

Il limite del bianco (LoB), il limite di rilevamento (LoD) e il limite della determinazione quantitativa (LoQ) sono stati definiti basandosi sulla procedura CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" utilizzando 6 bianchi e 6 campioni a basso livello.

Sensibilità	Concentrazione	
	Siero/plasma	Urina
Limite del bianco (LoB)	0,9	4,2
Limite di rilevamento (LoD)	10,1	16,1
Limite della determinazione quantitativa (LoQ)	28,0	38,3

16.2. Esattezza

L'esattezza è stata dimostrata mediante il confronto tra il test Aldosterone ELISA e il metodo con spettrometro di massa a diluizione isotopica (ID/GC/MS) DGKC con un pannello di campioni di plasma nativi.

		pg/mL
Regressione di Lineale		
Pendenza		1,01
Intercetta		25,80
Coefficiente di correlazione, r		0,99

16.3. Precisione

La precisione del test Aldosterone ELISA è stata determinata eseguendo un complesso studio di precisione.

Campioni di plasma

Ripetibilità: un totale di 6 campioni di EDTA plasma è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori.

I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (pg/mL)	Intra-test (ripetibilità)	
			DS	% CV
1	75	87,2	8,8	10,0%
2	75	233,3	19,6	8,4%
3	75	351,8	23,1	6,6%
4	75	564,1	42,7	7,6%
5	75	1028,4	59,0	5,7%
6	75	1136,6	51,3	4,5%

Riproducibilità: un totale di 6 campioni di EDTA plasma è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori.

I risultati per i dati combinati di due lotti sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (pg/mL)	All'interno del laboratorio (riproducibilità)	
			DS	% CV
1	150	86,9	8,5	9,8%
2	150	235,5	24,7	10,5%
3	150	353,7	37,1	10,5%
4	150	570,4	50,4	8,8%
5	150	1035,6	71,6	6,9%
6	150	1136,8	64,7	5,7%

Campioni di urina

Ripetibilità: un totale di 6 campioni di urina è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori.

I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (pg/mL)	Intra-test (ripetibilità)	
			DS	% CV
1	75	122,9	12,7	10,3%
2	75	218,9	16,8	7,7%
3	75	323,4	20,1	6,2%
4	75	563,1	27,6	4,9%
5	75	1027,3	54,0	5,3%
6	75	1187,9	42,1	3,5%

Riproducibilità: un totale di 6 campioni di urina è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori.

I risultati per i dati combinati di due lotti sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (pg/mL)	All'interno del laboratorio (riproducibilità)	
			DS	% CV
1	150	123,5	18,9	15,3%
2	150	219,3	24,4	11,1%
3	150	322,0	31,0	9,6%
4	150	555,8	48,5	8,7%
5	150	1003,4	93,8	9,4%
6	150	1170,3	76,9	6,6%

16.4. Linearità

La linearità è stata valutata secondo le linee guida basate su CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures".

È stata preparata una diluizione seriale di campioni di plasma/urina ad alta e bassa concentrazione per creare un pannello da sopra il limite superiore di linearità (ULL) a sotto il limite inferiore di quantificazione (LLOQ).

Per quanto riguarda la concentrazione di aldosterone misurata nei campioni di plasma mediante il test Aldosterone ELISA, la procedura di misurazione evidenzia un comportamento lineare nell'intervallo tra 15,4 e 1394 pg/mL entro la deviazione ammissibile di linearità (ADL) di $\pm 15\%$ o $\leq \pm 28$ pg/mL al di sotto di LoQ.

Per quanto riguarda la concentrazione di aldosterone determinata mediante il test Aldosterone ELISA, la procedura di misurazione evidenzia un comportamento lineare nell'intervallo tra 20,6 e 1635,8 pg/mL entro la deviazione ammissibile di linearità (ADL) di $\pm 15\%$ o $\leq \pm 38,3$ pg/mL al di sotto di LoQ.

16.5. Confronto del metodo

Il test Aldosterone ELISA è stato confrontato con un metodo ELISA manuale quantitativo disponibile in commercio, in base al documento CLSI EP-9C, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Ogni metodo ha esaminato un totale di 106 campioni di plasma selezionati per rappresentare un ampio intervallo di concentrazioni di aldosterone. Sui dati comparativi è stata eseguita l'analisi di regressione di Passing-Bablok con i seguenti risultati:

n	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (pg/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
106	1,1 [1,0 to 1,2]	-3,9 [-13,2 to 5,2]	0,98

Ogni metodo ha esaminato un totale di 114 campioni di urina, selezionati per rappresentare un ampio intervallo di concentrazioni di aldosterone. Sui dati comparativi è stata eseguita l'analisi di regressione di Passing-Bablok con i seguenti risultati:

n	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (pg/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
114	0,95 [0,9 to 1,0]	18,9 [10,7 to 27,8]	1,0

16.6. Specificità analitica

La specificità è stata valutata con i seguenti reagenti crociati e valutata separatamente sia nel plasma che nell'urina.

Reagente crociato	Concentrazione testata (unità)	Reattività crociata media %	
		Plasma	Urina
Corticosterone	0,1 mg/mL	0,1%	0,1%
Androsterone	5 mg/mL	0,0%	0,0%
Cortisone	0,1 mg/mL	0,0%	0,1%
Diidrotosterone (DHT)	0,5 mg/mL	0,0%	0,0%
Estradiolo	10 mg/mL	0,0%	0,0%
Estrone	10 mg/mL	0,0%	0,0%
Estriolo	10 mg/mL	0,0%	0,0%
Testosterone	0,2 mg/mL	0,0%	0,0%
DHEA-S	10 mg/mL	0,0%	0,0%

Campioni di plasma

Le seguenti sostanze non interferiscono con un bias $> \pm 15\%$ nel dosaggio Aldosterone ELISA quando le concentrazioni sono inferiori alla soglia dichiarata presentata nella tabella seguente.

Reagente potenzialmente interferente	Concentrazione di soglia
Bilirubina, coniugata	15 mg/dL
Bilirubina, non coniugata	10 mg/dL
Emoglobina	200 mg/dL
Proteine totali	8.3 g/dL
Trigliceridi	500 mg/dL

Campioni di urina

Le seguenti sostanze non interferiscono con un bias $> \pm 15\%$ nel dosaggio Aldosterone ELISA quando le concentrazioni sono inferiori alla soglia dichiarata presentata nella tabella seguente.

Reagente potenzialmente interferente	Concentrazione di soglia
Proteina	80 mg/dL
Cloruro di sodio	0.5 M
Urea	700 mM
Creatinina	10 mM
Glucosio	4 mM
Acido borico	20 g/L

16.7. Studio su siero-plasma

È stato condotto uno studio di confronto tra matrici del test Aldosterone ELISA per valutare la differenza tra i tipi di provette (provette per siero, separazione del siero (SST), plasma in litio eparina e plasma in sodio eparina) rispetto ai campioni di controllo (K2 EDTA) secondo le linee guida CLSI EP35-Ed1. Sono stati utilizzati in totale 22 campioni (18 nativi, 4 additivati o diluiti). L'analisi di regressione di Passing-Bablok è stata effettuata su dati comparativi:

Tipo di campione	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (pg/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
Siero	0,98 [0,9 to 1,0]	-12,25 [-30,1 to 5,6]	1,0
SST	1,03 [1,0 to 1,1]	-11,6 [-37 to 13,8]	1,0
Litio eparina	0,98 [0,9 to 1,0]	-3,4 [-28,5 to 21,7]	1,0
Sodio eparina	0,94 [0,9 to 1,0]	-6,4 [-22,4 to 9,5]	1,0

17. LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*⁶. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

18. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

Tutti i materiali che sono venuti a contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

19. BIBLIOGRAFIA

1. Williams Textbook of Endocrinology, 10th Edition, Editors Larsen, Kronenberg, Melmed, Polonski, Willson
2. Duncan J. Campbell, Juerg Nussberger, Michael Stowasser, A.H. Jan Danser, Alberto Morganti, Erik Frandsen, and Joël Menard, Activity Assays and Immunoassays for Plasma Renin and Prorenin: Information Provided and Precautions Necessary for Accurate Measurement. Clinical Chemistry 55:5, 867–877 (2009).
3. John W. Funder et al. Case Detection, Diagnosis and Treatment of Patients with Primary

Aldosteronism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J. Clin Endocrinol. Metab. September 2008 93 (9) 2266-3281.

4. Caroline Schirpenbach, Lysann, Seiler, Christiane Maser-Gluth, Felix Beuschlein, Martin Reincke and Martin Bidlingmaier Automated Chemiluminescence-Immunoassay for Aldosterone during Dynamic Testing: Comparison to Radioimmunoassays with and without Extraction Steps. Clinical Chemistry. 52-9 1749-1755 (2006).
5. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
6. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. Clin Chem, 34, 1988, pp 27-33

20. IDENTIFICATORE DELLE REVISIONI

Le aggiunte o le modifiche alle istruzioni per l'uso sono indicate dall'evidenziazione in grigio.

21. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regolamento

2017/746/UE relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda: www.diametra.com.

Ed. 03/2024

DCM053-13



DCM053-13

Ed. 03/2024

ALDOSTERONE ELISA

for routine analysis

Immunoenzymatic determination of Aldosterone in human serum, human plasma or urine.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO053

1. INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use

For Laboratory Professional Use

Aldosterone ELISA is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of Aldosterone in human serum, plasma or urine from an adult population. Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data as an aid in the diagnosis of hypertension related syndromes.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Aldosterone is a steroid hormone produced by the zona glomerulosa of the adrenal cortex in the adrenal gland. It plays a primary role in the regulation of sodium and potassium balance in the blood¹. Aldosterone secretion is stimulated primarily via the renin angiotensin-aldosterone system (RAAS). The production of renin is stimulated when there is a reduction in renal perfusion pressure, reduction in plasma volume and a negative sodium balance. Renin cleaves Angiotensinogen into Angiotensin I which ultimately leads to the production of Angiotensin II via angiotensin converting enzyme². Angiotensin II acts on the vascular system causing vasoconstriction as well as stimulating the adrenal cortex to secrete aldosterone. Aldosterone acts on mineralocorticoid receptors within the principal cells of the distal tubule to increase reabsorption of sodium and chloride and decrease reabsorption of potassium and hydrogen. Aldosterone measurements are used in the diagnosis and treatment of primary aldosteronism^{3,4} (a disorder caused by excessive secretion of aldosterone by the adrenal gland), hypertension caused by primary aldosteronism, selective hyperaldosteronism, edematous states and other conditions of electrolyte balance.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The Aldosterone ELISA is a competitive enzyme immunometric assay (ELISA) where aldosterone (antigen) in the sample competes with the antigenic aldosterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti- aldosterone coated on the microplate (solid phase).

After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid phase washing. Then, the enzyme HRP in

the bound fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added. The colour intensity is inversely proportional to the aldosterone concentration in the sample.

Aldosterone concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

4.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

Contains ProClin > 0.0015% and BSA

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

2. Controls (2 vial, 1 mL each)

Contains ProClin > 0.0015% and BSA

Control A	REF DCE045/5303A-0
Control B	REF DCE045/5303B-0

Control concentration is indicated on the Certificate of Analysis

3. Conjugate (1 vial, 15 mL)

Aldosterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP).

Contains ProClin < 0.0015% and BSA

REF DCE002/5302-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with anti- aldosterone antibody

REF DCE002/5303-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

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

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

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

REF DCE005-0

7. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)

Contains ProClin > 0.0015%

0.2M Phosphate buffer pH 7,4

REF DCE054-0

4.2. Materials required but not provided

Distilled water

PBS buffer pH 7.4

TRIS buffer 1M pH 8.5

4.3. Auxiliary materials and instrumentation

Polypropylene tubes (for urine samples)

Automatic dispenser

Precision Pipetting Devices

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

5. WARNINGS

- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of ProClin™ 300 as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- The TMB Substrate contains an irritant, which harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to direct sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

6. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately validated for its intended use/purpose.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8°C in the dark.

- The kit is stable at 2 – 8°C until the expiry date stated on the external kit label.
- Once opened, the kit is stable at 2 – 8°C for 6 months*.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

* in use stability data supports reagent stability when used two times within this period.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel), plasma (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) or urine samples.

Sample Storage	Duration
2 – 8 °C (serum, plasma & urine)	96 hours
Freeze/thaw cycles (serum, plasma & urine)	3 cycles
-20°C (plasma & urine)	12 months

9. PROCEDURE

9.1. Preparation of Calibrators and Controls

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

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	40	80	300	800	1260

Mix gently on a roller mixer for at least 5 minutes before using.

The Controls are ready to use.

9.2. Preparation of the Conjugate

Ready to use. Mix gently for 5 minutes on a roller mixer.

9.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio.

It is possible to observe the presence of crystals within the concentrated wash solution; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals. For greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care also to transfer crystals completely by rinsing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

9.4. Preparation of Samples

The determination of Aldosterone can be performed in human serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel), plasma (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) or urine samples. Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a roller mixer.

9.4.1. Serum or plasma samples

For serum or plasma samples proceed to section 9.5

9.4.2. Urine samples

To obtain urine samples use the following procedure:

- Pipette 25 µL of each urine sample into a polypropylene tube

- Add 25 µL of 1M HCl to every tube and mix thoroughly
- Cap and incubate at 2 – 8°C for 24h in the dark
- Add 25 µL of TRIS pH 8.5 to every tube and mix thoroughly
- Add 400 µL of PBS buffer
- Use 50 µL of this solution to perform the assay as stated in section 9.5

Note: this pretreatment leads to a 1:19 dilution. The dilution factor 19 has to be taken into account for the calculation of the final concentration of the urine sample. Please refer to section 11

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

9.5. Procedure

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

Reagent	Calibrator	Samples/ Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	50 µL		
Samples/ Controls		50 µL	

Incubate at 22 – 28°C for 30 minutes.

Conjugate	100 µL	100 µL	
-----------	--------	--------	--

Incubate at 22 – 28°C for 1 hour.

Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.

Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Incubate at 22 – 28°C for 20 minutes in the dark.

Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

10. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The controls provided in the kit should be tested as unknowns and are intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

The mean concentration of each control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

DiaMetra recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories⁵.

11. CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) curve fit, **including Calibrator 0 is required.**

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Calibrator 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

In order for the assay results to be considered valid the kit calibrators and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

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

Conversion of units:

pg/mL / 10 = ng/dL

pg/mL x 2.774 = pmol/L

For urine samples the concentration in pg/mL read from the calibration curve has to be multiplied to the **dilution factor 19**.

To convert the Aldosterone concentration in "mcg Aldosterone/24h" (µg Aldosterone/24h), calculate as above and correct for total volume of urine collected in 24 hours:

$$\frac{\text{pg/mL} \times \text{Vol (mL) urine in 24hr}}{1,000,000} = \text{mcg Aldosterone/24hr}$$

12. MEASURING RANGE

The assay measuring range (AMR) for plasma samples is 28.0 – 1260 pg/mL.

Any value that reads below 28.0 pg/mL should be reported as "< 28.0 pg/mL". Any value that reads above 1260 pg/mL should be reported as "> 1260 pg/mL".

The assay measuring range (AMR) for urine samples is 38.3 – 1260 pg/mL.

Any value that reads below 38.3 pg/mL should be reported as "< 38.3 pg/mL". Any value that reads above 1260 pg/mL should be reported as "> 1260 pg/mL".

13. METROLOGY AND TRACEABILITY

The Aldosterone ELISA has been standardised against in-house reference standards which have been value assigned by the Isotope dilution mass spectrometry (ID/GC/MS) from DGKC.

14. Uncertainty of Measurement

The uncertainty associated with the measurement of the assay calibrators (C₀ – C₅) was determined following CLSI EP29-A "Expression of Measurement Uncertainty in Laboratory Medicine; Approved Guideline". The uncertainty for each calibrator level was assessed over a minimum of 5 days (1 run per day) by 3 different operators. Result from one representative lot:

Calibrator	Mean conc. (pg/mL)	95% CI (pg/mL)		Calibrator uncertainty Uc (pg/mL)
CAL0	<LoB	N/A		N/A
CAL1	39.6	28.2	51.0	4.6
CAL2	84.3	64.1	104.5	6.0
CAL3	299.0	212.6	385.3	23.0
CAL4	792.2	737.9	846.4	43.9
CAL5	1271.4	1103.1	1439.7	37.0

15. EXPECTED VALUES

The following ranges were determined using the Aldosterone ELISA and are provided for information only. The 95% reference interval for apparently healthy adults were calculated by a non-parametric method following guidance from CLSI C28-A3 "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

	n	Median	Normal range
Plasma samples (pg/mL)			
Upright	60	37.4	<28.0 – 221.8
Supine	60	45.5	<28.0 – 141.5
Urine samples (mcg/24 hr)			
	120	10.5	3.4 – 23.2

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

16. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

16.1. Detection Capability

The limit of blank (LoB), limit of detection (LoD) and limit of quantitation (LoQ) were determined with guidance from CLSI EP17-A2, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" using 6 blanks and 6 low level samples.

Sensitivity	Concentration	
	Plasma	Urine
Limit of Blank (LoB)	0.9	4.2
Limit of Detection (LoD)	10.1	16.1
Limit of Quantitation (LoQ)	28.0	38.3

16.2. Trueness

Trueness has been demonstrated through comparison of the Aldosterone ELISA to the isotope dilution mass spectrometry (ID/GC/MS) method from DGKC with a panel of native plasma samples.

	pg/mL
Linear regression	
Slope	1.01
Intercept	25.80
Correlation Coefficient, r	0.99

16.3. Precision

Precision of the Aldosterone ELISA was determined by performing a complex precision study.

Plasma samples

Repeatability: A total of 6 EDTA plasma samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators.

Data from one representative lot is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (pg/mL)	Within run (Repeatability)	
			SD	CV%
1	75	87.2	8.8	10.0%
2	75	233.3	19.6	8.4%
3	75	351.8	23.1	6.6%
4	75	564.1	42.7	7.6%
5	75	1028.4	59.0	5.7%
6	75	1136.6	51.3	4.5%

Reproducibility: A total of 6 EDTA plasma samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators.

Results for the combined data from two lots is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (pg/mL)	Within Laboratory (Reproducibility)	
			SD	CV%
1	150	86.9	8.5	9.8%
2	150	235.5	24.7	10.5%
3	150	353.7	37.1	10.5%
4	150	570.4	50.4	8.8%
5	150	1035.6	71.6	6.9%
6	150	1136.8	64.7	5.7%

Urine samples

Repeatability: A total of 6 urine samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators.

Data from one representative lot is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (pg/mL)	Within run (Repeatability)	
			SD	CV%
1	75	122.9	12.7	10.3%
2	75	218.9	16.8	7.7%
3	75	323.4	20.1	6.2%
4	75	563.1	27.6	4.9%
5	75	1027.3	54.0	5.3%
6	75	1187.9	42.1	3.5%

Reproducibility: A total of 6 urine samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Results for the combined data from two lots is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (pg/mL)	Within Laboratory (Reproducibility)	
			SD	CV%
1	150	123.5	18.9	15.3%
2	150	219.3	24.4	11.1%
3	150	322.0	31.0	9.6%
4	150	555.8	48.5	8.7%
5	150	1003.4	93.8	9.4%
6	150	1170.3	76.9	6.6%

16.4. Linearity

Linearity was evaluated based on CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". A serial dilution of high and low plasma / urine samples was prepared to create a panel from above the upper limit of linearity (ULL) to below the lower limit of quantitation (LLOQ).

For aldosterone concentration measured in plasma samples by Aldosterone ELISA, the measurement procedure shows linearity for the interval from 15.4 to 1394 pg/mL within the allowable deviation of linearity (ADL) of $\pm 15\%$ or $\leq \pm 28$ pg/mL below LoQ.

For aldosterone concentration measured in urine samples by Aldosterone ELISA, the measurement procedure shows linearity for the interval from 20.6 to 1635.8 pg/mL within the allowable deviation of linearity (ADL) of $\pm 15\%$ or $\leq \pm 38.3$ pg/mL below LoQ.

16.5. Method comparison

The Aldosterone ELISA was compared against a commercially available quantitative manual ELISA method, following CLSI EP-9C, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". A total of 106 plasma samples selected to represent a wide range of aldosterone concentrations, were assayed by each method. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

n	Slope [95% CI]	Intercept (pg/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
106	1.1 [1.0 to 1.2]	-3.9 [-13.2 to 5.2]	0.98

A total of 114 urine samples, selected to represent a wide range of aldosterone concentrations, were assayed by each method. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

n	Slope [95% CI]	Intercept (pg/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
114	0.95 [0.9 to 1.0]	18.9 [10.7 to 27.8]	1.0

16.6. Analytical Specificity

The specificity was assessed with the following cross-reactants – assessed separately in both plasma and urine.

Cross-reactant	Concentration tested (unit)	Mean Cross reactivity	
		Plasma	Urine
Corticosterone	0.1 mg/mL	0.1%	0.1%
Androsterone	5 mg/mL	0.0%	0.0%
Cortisone	0.1 mg/mL	0.0%	0.1%
Dihydrotestosterone (DHT)	0.5 mg/mL	0.0%	0.0%
Estradiol	10 mg/mL	0.0%	0.0%
Estrone	10 mg/mL	0.0%	0.0%
Estriol	10 mg/mL	0.0%	0.0%
Testosterone	0.2 mg/mL	0.0%	0.0%
DHEA-S	10 mg/mL	0.0%	0.0%

Plasma samples

The following substances do not interfere with a bias of $> \pm 15\%$ in the Aldosterone ELISA assay when the concentrations are below the stated threshold presented in the following table.

Potentially Interfering Reagent	Threshold Concentration
Bilirubin, conjugated	15 mg/dL
Bilirubin, unconjugated	10 mg/dL
Haemoglobin	200 mg/dL
Total Protein	8.3 g/dL
Triglyceride	500 mg/dL

Urine samples

The following substances do not interfere with a bias of $> \pm 15\%$ in the Aldosterone ELISA assay when the concentrations are below the stated threshold presented in the following table.

Potentially Interfering Reagent	Threshold Concentration
Protein	80 mg/dL
Sodium Chloride	0.5 M
Urea	700 mM
Creatinine	10 mM
Glucose	4 mM
Boric Acid	20 g/L

16.7. Serum-plasma study

The Aldosterone ELISA matrix comparison study was performed to evaluate the difference across tube types (serum, serum separator tubes (SST), lithium heparin plasma and sodium heparin plasma) versus the control samples (K2 EDTA) following CLSI EP35-Ed1 guidelines. A total of 22 samples (18 native, 4 spiked or diluted) were evaluated. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

Sample type	Slope [95% CI]	Intercept (pg/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
Serum	0.98 [0.9 to 1.0]	-12.25 [-30.1 to 5.6]	1.0
SST	1.03 [1.0 to 1.1]	-11.6 [-37 to 13.8]	1.0
Lithium Heparin	0.98 [0.9 to 1.0]	-3.4 [-28.5 to 21.7]	1.0
Sodium Heparin	0.94 [0.9 to 1.0]	-6.4 [-22.4 to 9.5]	1.0

17. LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays⁶. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.

18. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

19. BIBLIOGRAPHY

1. Williams Textbook of Endocrinology, 10th Edition, Editors Larsen, Kronenberg, Melmed, Polonski, Willson
2. Duncan J. Campbell, Juerg Nussberger, Michael Stowasser, A.H. Jan Danser, Alberto Morganti, Erik Frandsen, and Joël Menard, Activity Assays and Immunoassays for Plasma Renin and Prorenin: Information Provided and Precautions Necessary for Accurate Measurement. *Clinical Chemistry* 55:5, 867–877 (2009).
3. John W. Funder et al. Case Detection, Diagnosis and Treatment of Patients with Primary Aldosteronism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin Endocrinol. Metab.* September 2008 93 (9) 2266-3281.
4. Caroline Schirpenbach, Lysann, Seiler, Christiane Maser-Gluth, Felix Beuschlein, Martin Reincke and Martin Bidlingmaier Automated Chemiluminescence-Immunoassay for Aldosterone during Dynamic Testing: Comparison to Radioimmunoassays with and without Extraction Steps. *Clinical Chemistry*. 52:9 1749-1755 (2006).
5. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
6. Boscatto, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

20. REVISION IDENTIFIER

Additions or changes to the IFU are indicated by grey highlighting.

21. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority.

The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found below and on the company website: www.diametra.com.

Ed. 03/2024

DCM053-13



DCM053-13

Ed. 03/2023

ALDOSTERONE ELISA

para el análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática de aldosterona en suero, plasma u orina humanos.

IVD



LOT

Ver etiqueta
externa

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ pruebas

REF DKO053

1. FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

Aldosterone ELISA es un dispositivo manual para diagnóstico *in vitro* diseñado para la determinación cuantitativa de aldosterona en suero, plasma u orina humanos de una población adulta. Los resultados deben utilizarse como ayuda en el diagnóstico de síndromes relacionados con la hipertensión junto con otros datos clínicos y de laboratorio.

2. IMPORTANCIA CLÍNICA

Aldosterona es una hormona esteroide producida en la zona glomerular de la corteza suprarrenal en la glándula suprarrenal. Desempeña un papel esencial en la regulación del equilibrio del sodio y el potasio en la sangre¹. La secreción de aldosterona se estimula principalmente a través del sistema de renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). Se estimula la producción de renina cuando se produce una reducción en la presión de perfusión renal, una reducción del volumen de plasma y un equilibrio de sodio negativo. La renina separa el angiotensinógeno en angiotensina I que, finalmente, da lugar a la producción de angiotensina II mediante la enzima convertidora de angiotensina². Angiotensina II actúa sobre el sistema vascular causando vasoconstricción además de estimular a la corteza suprarrenal para secretar aldosterona. La aldosterona actúa sobre los receptores de mineralocorticoides (MR) en las células principales del túbulo distal para aumentar la reabsorción de sodio y cloro y disminuir la reabsorción de potasio e hidrógeno. Las mediciones de aldosterona se usan en el diagnóstico y tratamiento de aldosteronismo primario^{3,4} (un trastorno causado por la excesiva secreción de aldosterona por la glándula suprarrenal), hipertensión causada por aldosteronismo primario, hiperaldosteronismo selectiva, estados edematosos y otros trastornos de equilibrio hidroelectrolítico.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El Aldosterone ELISA es un ensayo enzimático inmunométrico competitivo (ELISA) en el que la aldosterona (antígeno) de la muestra compete con la aldosterona antigénica conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) para unirse al número limitado de anticuerpos antialdosterona recubiertos en la microplaca (fase sólida).

Tras la incubación, la separación ligada/libre se realiza mediante un simple lavado en fase sólida. A continuación, la enzima HRP de la fracción ligada reacciona con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato de TMB, y desarrolla un color azul que cambia a amarillo cuando se añade la solución de detención (H_2SO_4). La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de aldosterona de la muestra.

La concentración de aldosterona de la muestra se calcula mediante una curva de calibración.

4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (6 viales de 1 mL cada uno)

Contiene ProClin > 0,0015 % y BSA.

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

2. Controles (2 viales de 1 mL cada uno)

Contiene ProClin > 0,0015 % y BSA.

Control A	REF DCE045/5303A-0
Control B	REF DCE045/5303B-0

La concentración de los controles se indica en el certificado de análisis.

3. Conjugado (1 vial, 15 mL)

Aldosterona conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP). Contiene ProClin < 0,0015 % y BSA.

REF DCE002/5302-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca que se puede romper)

Microplaca recubierta de anticuerpos antialdosterona.

REF DCE002/5303-0

5. Sustrato de TMB (1 vial, 15 mL)

 H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

6. Solución de detención (1 vial, 15 mL)

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

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc. 10X (1 vial, 50 mL)

Contiene ProClin > 0,0015 %.

Tampón de fosfato 0,2 M, pH 7,4 REF DCE054-0

4.2. Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada

Tampón PBS pH 7.4

Tampón TRIS 1M pH 8.5

4.3. Materiales auxiliares e instrumentación

Tubos de polipropileno (para muestras de orina)

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

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

5. ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
- El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEB, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.
- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]
Sensibilización cutánea, categoría 1



Contiene: ProClin 300

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

- P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.
- P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.
- P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).
- P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
- P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.
- El sustrato de TMB contiene un irritante que es perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.
- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

6. PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente validado para su uso previsto.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de 10 minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, ictericas o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.
- Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras, los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2-8 °C en un lugar oscuro.

- El kit es estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, el kit es estable a 2-8 °C durante 6 meses*.
- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

* los datos de estabilidad en uso confirman la estabilidad del reactivo cuando se utiliza dos veces dentro de este período.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe llevarse a cabo usando muestras de suero (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel para la separación de suero), plasma (heparina de litio, heparina sódica, o EDTA de potasio) u orina.

Almacenamiento de muestras	Duración
2-8 °C (suero, plasma y orina)	96 días
Ciclos de congelación / descongelación (suero, plasma y orina)	3 ciclos
-20°C (plasma y orina)	12 meses

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Preparación de calibradores y controles

Los calibradores están listos para utilizarse y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	40	80	300	800	1260

Mezclar suavemente en un mezclador de rodillos durante al menos 5 minutos antes de usar.

Los controles están listos para su uso.

9.2. Preparación del conjugado

Preparado para el uso. Mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.3. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial «Solución de lavado conc. 10X» con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:10.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado

también de transferir los cristales enjuagando completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

9.4. Preparación de las muestras

La determinación de aldosterona se puede llevar a cabo usando muestras de suero humano (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel de separación de suero) o muestras de plasma (heparina de litio y heparina de sodio). Almacenar la muestra a -20 °C si la determinación no se lleva a cabo el mismo día que se recoge la muestra. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.4.1. Muestras de suero o plasma

Para las muestras de suero o plasma, continúe en la sección 9.5.

9.4.2. Muestras de orina

Para obtener muestras de orina, siga este procedimiento:

- Pipetee 25 µL de cada muestra de orina en un tubo de polipropileno.
- Añada 25 µL de 1M HCl a cada tubo y mezcle bien.
- Coloque el tapón e incube a 2-8 °C durante 24 h en la oscuridad.
- Añada 25 µL de TRIS pH 8,5 a cada tubo y mezcle bien.
- Añada 400 µL de tampón PBS.
- Utilice 50 µL de esta solución para realizar el ensayo como se indica en la sección 9.5.

Nota: con este pretratamiento se obtiene una dilución de 1:19. El factor de dilución de 19 tiene que tomarse en consideración para el cálculo de la concentración final de la muestra de orina. Consulte la sección 11.

Almacene la muestra a -20 °C si la determinación no se realiza el mismo día de la recogida de la muestra.

9.5. Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2-8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2-8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos por cada control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestras/ control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	50 µL		
Muestras/ controles		50 µL	

Incubar a 22-28 °C durante 30 minutos.

Conjugado	100 µL	100 µL	
-----------	--------	--------	--

Incubar a 22-28 °C durante 1 hora.

Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.

Nota importante: en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente.

Lavadora automática: si utiliza un equipo automático, lave los pocillos al menos 5 veces.

Sustrato de TMB	100 µL	100 µL	100 µL
-----------------	--------	--------	--------

Incubar a 22-28 °C durante 20 minutos en la oscuridad.

Solución de detención	100 µL	100 µL	100 µL
-----------------------	--------	--------	--------

Agite suavemente la microplaca.

Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.

10. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

DiaMetra recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los ensayos que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de la calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control⁵.

11. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. Es necesario un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL), **incluido el calibrador 0**.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El calibrador 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los calibradores y el control del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el certificado de análisis específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

Interpole los valores de las muestras en la curva de calibración para obtener los valores correspondientes de las concentraciones expresadas en pg/mL.

Conversión de unidades:

pg/mL / 10 = ng/dL

pg/mL x 2,774 = pmol/L

Para muestras de orina la concentración en pg/mL leída en la curva de calibración tiene que multiplicarse por el factor de dilución de 19.

Para convertir la concentración de aldosterona en «mcg de aldosterona/24 h» (µg de aldosterona/24 h), calcule según lo anterior y corrija el volumen total de orina recogida en 24 horas:

$$\frac{\text{pg/mL} \times \text{Vol (mL) de orina en 24 h}}{1\,000\,000} = \text{mcg aldosterona/24 h}$$

12. RANGO DE MEDICIÓN

El rango de medición del ensayo (AMR) en muestras de plasma es de 28,0 – 1260 pg/mL.

Cualquier valor que sea inferior a 28,0 pg/mL debe informarse como «< 28,0 pg/mL». Cualquier valor que sea superior a 1260 pg/mL debe informarse como «> 1260 pg/mL».

El rango de medición del ensayo (AMR) en muestras de orina es de 38,3 – 1260 pg/mL. Cualquier valor que sea inferior a 38,3 pg/mL debe informarse como «< 38,3 pg/mL». Cualquier valor que sea superior a 1260 pg/mL debe informarse como «> 1260 pg/mL».

13. METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD

El Aldosterone ELISA se ha estandarizado frente a los estándares de referencia del centro a los cuales se les ha asignado valor utilizando la espectrometría de masas con dilución isotópica (ID/GC/MS) de DGKC.

14. Incertidumbre de medición

La incertidumbre asociada a la medición de los calibradores del ensayo (C₀ – C₅) se determinó siguiendo el siguiente documento: CLSI EP29-A “Expression of Measurement Uncertainty in Laboratory Medicine; Approved Guideline”. 3 operadores diferentes evaluaron la incertidumbre para cada nivel del calibrador durante un mínimo de 5 días (1 análisis por día). Resultado de un lote representativo:

Calibra tor	Concentra ción media (nmol/L)	95% CI (pg/mL)		Incertidum bre del calibrador (nmol/L)
CAL0	<LoB	N/A		N/A
CAL1	39,6	28,2	51,0	4,6
CAL2	84,3	64,1	104,5	6,0
CAL3	299,0	212,6	385,3	23,0
CAL4	792,2	737,9	846,4	43,9
CAL5	1271,4	1103,1	1439,7	37,0

15. VALORES ESPERADOS

Los rangos siguientes se determinaron usando el Aldosterone ELISA y se facilitan solo con fines informativos. El intervalo de referencia del 95 % para adultos aparentemente sanos se calculó mediante un método no paramétrico siguiendo la orientación de CLSI C28-A3 “Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory”.

	n	Mediana	Rango normal
Muestras de plasma (pg/mL)			
Vertical	60	37,4	<28,0 – 221,8
Supina	60	45,5	<28,0 – 141,5
Muestras de orina (mcg/24 hr)	120	10,5	3,4 – 23,2

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

16. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

16.1. Capacidad de detección

El límite de blanco (LoB), el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se determinaron con orientación del documento CLSI EP17-A, “Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation, usando 6 blancos y 6 muestras de bajo nivel.

Sensibilidad	Concentración (pg/mL)	
	Suero/ plasma	Orina
Límite de blanco (LoB)	0.9	4.2
Límite de detección (LoD)	10.1	16.1
Límite de cuantificación (LoQ)	28.0	38.3

16.2. Veracidad

La veracidad se ha demostrado mediante la comparación del Aldosterone ELISA con el método de espectrometría de masa por dilución isotópica (ID/GC/MS) de DGKC con un panel de muestras de plasma nativas.

pg/mL	
Regresión de Lineal	
Pendiente	1,01
Interceptación	25,80
Coefficiente de correlación, r	0,99

16.3. Precisión

La precisión de Aldosterone ELISA se determinó mediante la realización de un estudio de precisión complejo.

Muestras de suero/plasma

Repetibilidad: se analizó un total de 6 muestras de EDTA plasma en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación, se muestran los datos de un lote representativo:

Muestra	n	Concentración media (pg/mL)	Intraprueba (repetibilidad)	
			DE	CV %
1	75	87,2	8,8	10,0%
2	75	233,3	19,6	8,4%
3	75	351,8	23,1	6,6%
4	75	564,1	42,7	7,6%
5	75	1028,4	59,0	5,7%
6	75	1136,6	51,3	4,5%

Reproducibilidad: se analizó un total de 6 muestras de EDTA plasma en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación, se muestran los resultados de los datos combinados de dos lotes:

Muestra	n	Concentración media (pg/mL)	Dentro del laboratorio (reproducibilidad)	
			DE	CV %
1	150	86,9	8,5	9,8%
2	150	235,5	24,7	10,5%
3	150	353,7	37,1	10,5%
4	150	570,4	50,4	8,8%
5	150	1035,6	71,6	6,9%
6	150	1136,8	64,7	5,7%

Muestras de orina

Repetibilidad: se analizó un total de 6 muestras de orina en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación, se muestran los datos de un lote representativo:

Muestra	n	Concentración media (pg/mL)	Intraprueba (repetibilidad)	
			DE	CV %
1	75	122,9	12,7	10,3%
2	75	218,9	16,8	7,7%
3	75	323,4	20,1	6,2%
4	75	563,1	27,6	4,9%
5	75	1027,3	54,0	5,3%
6	75	1187,9	42,1	3,5%

Reproducibilidad: se analizó un total de 6 muestras de orina en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación, se muestran los resultados de los datos combinados de dos lotes:

Muestra	n	Concentración media (pg/mL)	Dentro del laboratorio (reproducibilidad)	
			DE	CV %
1	150	123,5	18,9	15,3%
2	150	219,3	24,4	11,1%
3	150	322,0	31,0	9,6%
4	150	555,8	48,5	8,7%
5	150	1003,4	93,8	9,4%
6	150	1170,3	76,9	6,6%

16.4. Linealidad

La linealidad se evaluó en base a CLSI EP-06, «Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures». Se preparó una dilución en serie de muestras altas y bajas de plasma o orina para crear un panel desde por encima del límite superior de linealidad (ULL) hasta por debajo del límite inferior de cuantificación (LLOQ).

Para la concentración de aldosterona medida en muestras de suero/plasma mediante el Aldosterone ELISA, la medición muestra linealidad para el intervalo de 15,4 a 1394 pg/mL dentro de la desviación de linealidad permitida (ADL) de $\pm 15\%$ o $\leq \pm 28$ pg/mL por debajo de LoQ.

Para la concentración de aldosterona medida en muestras de orina mediante el Aldosterone ELISA, la medición muestra linealidad para el intervalo de 20,6 a 1635,8 pg/mL dentro de la desviación de linealidad permitida (ADL) de $\pm 15\%$ o $\leq \pm 38,3$ pg/mL por debajo de LoQ.

16.5. Comparación de métodos

El Aldosterone ELISA se comparó con un método ELISA manual cuantitativo disponible en el mercado siguiendo CLSI EP-9C, «Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples». Con cada método, se realizó el ensayo de un total de 106 muestras de plasma seleccionadas para representar un amplio intervalo de concentraciones de aldosterona. Se realizó el análisis de regresión Passing-Bablok sobre los datos comparativos:

n	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (pg/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
106	1,1 [1,0 to 1,2]	-3,9 [-13,2 to 5,2]	0,98

Con cada método, se realizó el ensayo de un total de 114 muestras de orina, seleccionadas para representar un amplio intervalo de concentraciones de aldosterona. Se realizó el análisis de regresión Passing-Bablok sobre los datos comparativos:

n	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (pg/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
114	0,95 [0,9 to 1,0]	18,9 [10,7 to 27,8]	1,0

16.6. Especificidad analítica

La especificidad se evaluó con los siguientes reaccionantes cruzados, evaluados de forma separada tanto en plasma como en orina.

Reaccionante cruzado	Concentración probada (unidad)	Promedio en de reactividad cruzada	
		Plasma	Orina
Corticosterona	0,1 mg/mL	0,1%	0,1%
Androsterona	5 mg/mL	0,0%	0,0%
Cortisona	0,1 mg/mL	0,0%	0,1%
Dihidrotestosterona (DHT)	0,5 mg/mL	0,0%	0,0%
Estradiol	10 mg/mL	0,0%	0,0%
Estrona	10 mg/mL	0,0%	0,0%
Estriol	10 mg/mL	0,0%	0,0%
Testosterona	0,2 mg/mL	0,0%	0,0%
DHEA-S	10 mg/mL	0,0%	0,0%

Muestras de plasma

Las siguientes sustancias no interfieren con un sesgo de $> \pm 15\%$ en el ensayo Aldosterone ELISA cuando las concentraciones están por debajo del umbral indicado presentado en la siguiente tabla.

Reactivos que pueden interferir	Límite máximo de concentración
Bilirrubina, conjugada	15 mg/dL
Bilirrubina, no conjugada	10 mg/dL
Hemoglobina	200 mg/dL
Proteína total	8,3 g/dL
Triglicéridos	500 mg/dL

Muestras de orina

Las siguientes sustancias no interfieren con un sesgo de $> \pm 15\%$ en el ensayo Aldosterone ELISA cuando las concentraciones están por debajo del umbral indicado presentado en la siguiente tabla.

Reactivos que pueden interferir	Límite máximo de concentración
Proteína	80 mg/dL
Cloruro de sodio	0.5 M
Urea	700 mM
Creatinina	10 mM
Glucosa	4 mM
Ácido bórico	20 g/L

16.7. Estudio en suero-plasma

El estudio de comparación de la matriz del Aldosterone ELISA se realizó para evaluar la diferencia entre los tipos de tubos (suero, tubos separadores de suero [SST], plasma de heparina de litio y plasma de heparina de sodio) frente a las muestras de control (K2 EDTA) siguiendo CLSI EP35-Ed1 guidelines. Se evaluaron un total de 22 muestras (18 naturales, 4 enriquecidas o diluidas). Se realizó el análisis de regresión de Passing-Bablok en los datos comparativos:

Tipo de muestra	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (pg/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
Suero	0,98 [0,9 to 1,0]	-12,25 [-30,1 to 5,6]	1,0
SST	1,03 [1,0 to 1,1]	-11,6 [-37 to 13,8]	1,0
Heparina de litio	0,98 [0,9 to 1,0]	-3,4 [-28,5 to 21,7]	1,0
Heparina sódica	0,94 [0,9 to 1,0]	-6,4 [-22,4 to 9,5]	1,0

17. LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*⁶. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

18. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

19. BIBLIOGRAFÍA

1. Williams Textbook of Endocrinology , 10th Edition, Editors Larsen, Kronenberg, Melmed, Polonski, Willson
2. Duncan J. Campbell, Juerg Nussberger, Michael Stowasser, A.H. Jan Danser, Alberto Morganti, Erik Frandsen, and Joël Menard, Activity Assays and Immunoassays for Plasma Renin and Prorenin: Information Provided and Precautions Necessary for Accurate Measurement. Clinical Chemistry 55:5, 867–877 (2009).

3. John W. Funder et al. Case Detection, Diagnosis and Treatment of Patients with Primary Aldosteronism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin Endocrinol. Metab.* September 2008 93 (9) 2266-3281.
4. Caroline Schirpenbach, Lysann, Seiler, Christiane Maser-Gluth, Felix Beuschlein, Martin Reincke and Martin Bidlingmaier Automated Chemiluminescence-Immunoassay for Aldosterone during Dynamic Testing: Comparison to Radioimmunoassays with and without Extraction Steps. *Clinical Chemistry*. 52-9 1749-1755 (2006).
5. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
6. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

20. IDENTIFICADOR DE REVISIÓN

Las adiciones o cambios en las instrucciones de uso se han resaltado en gris.

21. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar: Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro; si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional.

Puede contactar con el fabricante a través del servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: www.diametra.com.

Ed. 03/2024

DCM053-13

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