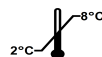


**Instructions for use**  
**Aldosterone ELISA**

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

**REF****MS E-5200****IVD****CE**

**Aldosterone ELISA****INTENDED USE**

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

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 standards, 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 standards is used to plot a standard 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:

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

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

- 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.
- Control materials or serum pools should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
- When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
- In order to reduce exposure to potentially harmful substances, gloves should be worn when handling kit reagents and human specimens.
- 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.
- A standard curve must be established for every run.
- The controls should be included in every run and fall within established confidence limits.
- 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.
- 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.
- 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.
- When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
- To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- 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.
- Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

## LIMITATIONS

- All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of aldosterone in human serum, plasma and urine. The kit is not calibrated for the determination of aldosterone in saliva or other specimens of human or animal origin.
- Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum or plasma.
- Any samples or control sera containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
- Only standard A may be used to dilute any high samples. Only the urine diluent may be used to dilute any high urine samples. The use of any other reagents may lead to false results.
- 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 standards 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.

Plasma: Approximately 0.2 ml of plasma is required per duplicate determination. Collect 4-5 ml of blood into EDTA plasma tubes. 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 0.2 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.

## SPECIMEN PRETREATMENT

Serum and plasma: This assay is a direct system; no specimen pretreatment is necessary.

Urine: Dilute urine samples 1:50 in urine diluent before use.

Example: To 1 ml of urine diluent, add 20 µl of urine sample.

## REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes to dispense 50, 100, 150 and 300 µl
- Disposable pipette tips
- Distilled or deionized water
- Plate shaker
- Microwell plate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater\* (see assay procedure step 10).
- *Urine Diluent - Required if urine samples are to be analysed. Used for dilution of urine specimens before assaying. Has to be ordered separately (MS E-5241; 20 mL)*

## REAGENTS PROVIDED

### AA E-0030 WASH-CONC 10x 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.

**AA E-0055**      SUBSTRATE      **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.

**AA E-0080**      STOP-SOLN      **Stopping Solution** - Ready To Use.  
 Contents:      One vial containing 1M sulfuric acid.  
 Volume:      6 mL/bottle  
 Storage:      Refrigerate at 2-8°C  
 Stability:      12 months or as indicated on label.

**Standards and Controls**- Ready To Use.

Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations:

Cat. no.	Symbol	Standard	Concentration	Volume/Vial
<b>MS E-5201</b>	<u>STANDARD</u> A	Standard A (0)	0 pg/ml	2.0 ml
<b>MS E-5202</b>	<u>STANDARD</u> B	Standard B (1)	15 pg/ml	0.6 ml
<b>MS E-5203</b>	<u>STANDARD</u> C	Standard C (2)	50 pg/ml	0.6 ml
<b>MS E-5204</b>	<u>STANDARD</u> D	Standard D (3)	200 pg/ml	0.6 ml
<b>MS E-5205</b>	<u>STANDARD</u> E	Standard E (4)	500 pg/ml	0.6 ml
<b>MS E-5206</b>	<u>STANDARD</u> F	Standard F (5)	1000 pg/ml	0.6 ml
<b>MS E-5251</b>	<u>CONTROL</u> 1	Control 1	Refer to vial labels for expected value and acceptable range!	0.6 ml
<b>MS E-5252</b>	<u>CONTROL</u> 2	Control 2		0.6 ml

Contents:      Aldosterone in a human serum-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking serum with a defined quantity of aldosterone.  
 Storage:      Refrigerate at 2-8°C  
 Stability:      12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the standards should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

**MS E-5231**      96      **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.



**MS E-5240**      CONJUGATE      **Aldosterone-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate** - Ready To Use

Contents:      Aldosterone-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.  
 Volume:      15 mL /bottle  
 Storage:      Refrigerate at 2-8°C  
 Stability:      12 months or as indicated on label.

## ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment: Serum and plasma: None

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

 Dilute <b>urine samples 1:50</b> with <b>Urine Diluent</b> before use.
<b>1.</b> Prepare <b>working solution</b> of the <b>wash buffer</b> . Dilute any urine samples if they are to be analyzed.
<b>2.</b> Remove the required number of microwell strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
<b>3.</b> Pipette <b>50 µL</b> of each <b>standard, control</b> and <b>specimen sample (serum, plasma or diluted urine)</b> into the corresponding wells in duplicate.
<b>4.</b> Pipette <b>100 µL</b> of the <b>aldosterone-HRP conjugate</b> into each well. (We recommend using a multichannel pipette).
<b>5.</b> Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for <b>1 hour</b> at <b>room temperature</b> .
<b>6.</b> Wash the wells <b>3 times</b> with prepared wash buffer ( <b>300 µL/well</b> for each wash) and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry (The use of a washer is recommended).
<b>7.</b> Pipette <b>150 µL</b> of <b>TMB substrate</b> into each well at timed intervals.
<b>8.</b> Incubate the plate on a plate shaker at <b>room temperature</b> for <b>15-20</b> minutes. (or until Standard A attains dark blue colour for desired OD).
<b>9.</b> Pipette <b>50 µl</b> of <b>stopping solution</b> into each well at the same timed intervals as in step 7.
<b>10.</b> Read the plate on a microwell plate reader at <b>450 nm</b> within 20 minutes after addition of the stopping solution.
 If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450nm filter is unavailable, a 405 or 415nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.

## CALCULATIONS

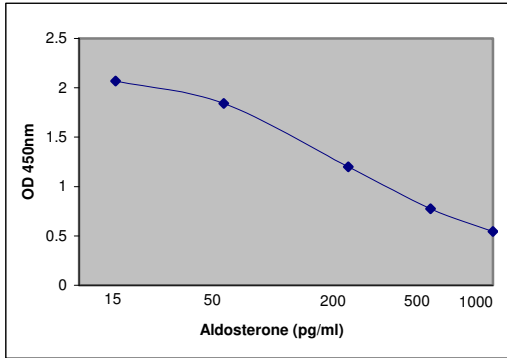
- Calculate the mean optical density of each standard duplicate.
- Draw a standard curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the standard concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter curve is recommended.
- Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
- Read the values of the serum and plasma samples directly off the standard curve.
- Read the values of the urine samples directly off the curve and multiply by a factor of 50. Next, multiply by the volume of collected 24-hour urine (in mL) to obtain values in pg/24 hour. Finally, divide the pg/24 hour values by  $1 \times 10^6$  to obtain values in µg/24 hour.
- If a serum or plasma sample reads more than 1000 pg/ml then dilute it with standard A at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor. If a urine sample reads more than 1000 pg/ml then dilute it with the urine diluent 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	Mean OD	Value (pg/mL)
A	2.278	0
B	2.167	15
C	1.798	50
D	0.950	200
E	0.485	500
F	0.322	1000
Unknown	1.383	103

**TYPICAL STANDARD CURVE**

Sample curve only. **Do not** use to calculate results.



**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**SENSITIVITY**

The limit of detection (LoD) was determined from the analysis of 60 samples of the blank and a low value sample and it was calculated as follows:

LoD =  $\mu_B + 1.645\sigma_B + 1.645\sigma_S$ , where  $\sigma_B$  and  $\sigma_S$  are the standard deviation of the blank and low value sample and  $\mu_B$  is the mean value of the blank.

The Limit of Detection (LoD) was determined to be 14 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, Estriol, Estrone and Testosterone.

**INTRA-ASSAY PRECISION**

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

Sample	Mean	SD	CV%
1	78.6	5.89	7.5
2	204	7.75	3.8
3	386	15.05	3.9

**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	18.36	1.72	9.4
2	128.52	12.50	9.7
3	505.77	48.55	9.6

### 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 Unspiked	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 Unspiked	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 Unspiked	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

### LINEARITY

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

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1	395.1	-	-
1:2	198.6	197.6	100.5
1:4	80.7	98.8	81.7
1:8	44.2	49.5	89.5
2	414.2	-	-
1:2	206.7	207.1	99.8
1:4	103.9	103.6	100.3
1:8	56.7	51.8	109.5

### EXPECTED NORMAL VALUES-SERUM / PLASMA

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

Group	n	Range (pg/ml)
Normal Salt Intake, Recumbent	120	15 - 133

### 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 ( $\mu\text{g}/24 \text{ hr}$ )
Normal Salt Intake	5-19

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







### 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.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

**Symbols:**

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	<b>LOT</b>	Batch code	<b>IVD</b>	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	<b>CONT</b>	Content	<b>CE</b>	CE labelled
	Caution	<b>REF</b>	Catalogue number	<b>RUO</b>	For research use only!



## VERWENDUNGSZWECK

Für die direkte quantitative Bestimmung von Aldosteron in menschlichem Serum, Plasma und Urin durch ein Enzymimmunoassay.  
Nur zu *in-vitro*-Diagnosezwecken.

Deutsch

## TESTPRINZIP

Das Prinzip des folgenden Enzymimmunoassays folgt dem typischen kompetitiven Bindungsszenario. Konkurrenz um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen auf der Mikrotiterplatte entsteht zwischen einem unmarkierten Antigen (in Standards, Kontrollen und Patientenproben vorhanden) und einem enzymmarkierten Antigen (Konjugat). Die Wasch- und Abgießschritte entfernen ungebundenes Material. Nach dem Waschschrift wird das Enzymsubstrat zugegeben. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet. Die Extinktion wird mit einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration von Aldosteron in der Probe. Eine Reihe von Standards wird verwendet, um eine Standardkurve zu erzeugen, von der die Mengen von Aldosteron in den Patientenproben und Kontrollen direkt abgelesen werden können.

## KLINISCHE ANWENDUNGEN

Aldosteron ist ein starkes Mineralcorticoid, deren Synthese und Freisetzung vom Renin-Angiotensin-System des Körpers gesteuert werden. Aldosteron fördert die Reabsorption von Natrium in den distalen Tubuli der Niere, was zu Kaliumsekretion mit Natriumretention führt, die das zirkulierende Blutvolumen steuert. Chronische Überproduktion und -sekretion von Aldosteron führt zu Bluthochdruck.

Messung von Aldosteron im Serum in Verbindung mit dem Plasmareinspiegel kann verwendet werden, um zwischen primärem und sekundärem Aldosteronismus unterscheiden.

Krankheitsbild	Serum-Aldosteron	Plasma-Renin
Primärer Aldosteronismus	Hoch	Niedrig
Sekundärer Aldosteronismus	Hoch	Hoch

Die Messung von Aldosteron im Verein mit selektiven Unterdrückungs- und Stimulationstests kann verwendet werden, um primären Aldosteronismus weiter in zwei Grundtypen zu differenzieren:

- Primärer Aldosteronismus aufgrund eines Adenoms einer oder beider Nebennieren.
- Primärer Aldosteronismus aufgrund von Nebennierenhyperplasie.

Diese Unterscheidung ist wichtig für die Behandlung der Krankheit. Nebennierenadenome reagieren gut auf Chirurgie, während hyperplastische Erkrankungen der Nebennieren in der Regel besser medikamentös behandelt werden. Zusammenfassend kann die präzise und genaue Messung des Serum-Aldosterons durch Enzymimmunoassay eine wichtige Ergänzung zu einem Satz diagnostischer Labortests für die differentielle Diagnose der Hypertonie sein.

## VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Anwender sollten für den erfolgreichen Einsatz dieses Kits das Protokoll gründlich verstanden haben. Zuverlässige Leistung wird nur durch strenge und sorgfältige Einhaltung der Anleitung erreicht.
- Kontrollmaterialien oder Serumpools sollten mit hoher und niedriger Konzentration in jeden Lauf zur Beurteilung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse einbezogen werden.
- Wenn Wasser zur Verdünnung oder Rekonstitution zu verwenden ist, ist demineralisiertes oder destilliertes Wasser einzusetzen.
- Um Kontakt mit potenziell schädlichen Substanzen zu reduzieren, sollten bei der Handhabung der Testreagenzien und Humanproben Handschuhe getragen werden.
- Alle Reagenzien und Proben sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich durchmischt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben.
- Für jeden Lauf muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Die Kontrollen sollten in jeden Lauf eingeschlossen werden und innerhalb etablierter Vertrauensgrenzen liegen.
- Unsachgemäße Verfahrenstechniken, unpräzises Pipettieren, unvollständiges Waschen und unsachgemäße Lagerung der Reagenzien können in Frage kommen, wenn die Messwerte für die Kontrollen nicht in den etablierten Bereichen liegen.
- Beim Lesen der Mikrotiterplatte beeinflussen Blasen in den Wells die Extinktionswerte (ODs). Entfernen Sie vor dem Messschritt jegliche Blasen sorgfältig.
- Die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich und sollte bei richtiger Lagerung farblos bleiben. Instabilität und Verunreinigung können an der Entstehung einer blauen Farbe erkannt werden, in welchem Fall die Lösung nicht verwendet werden sollte.
- Beim Dosieren von Substrat und Stopplösung verwenden Sie keine Pipetten, in denen diese Flüssigkeiten in Kontakt mit Metallteilen kommen.
- Um Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, verwenden Sie zur Entnahme aller Reagenzien, Proben, Standards und Kontrollen jeweils eine neue Einweg-Pipettenspitze.

- Verschiedene Chargen von Kit-Komponenten sind innerhalb eines Tests nicht zu mischen, und keine Komponente darf nach dem Verfallsdatum auf dem Etikett verwendet werden.
- Kit-Reagenzien müssen gemäß nationalen Vorschriften als gefährlicher Abfall entsorgt werden.

### **EINSCHRÄNKUNGEN**

- Alle Reagenzien in dem Kit sind für die direkte Bestimmung von Aldosteron in menschlichem Serum, Plasma und Urin geeicht. Das Kit ist nicht für die Bestimmung von Aldosteron in Speichel oder anderen Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs geeicht.
- Verwenden Sie keine stark hämolysierten, lipämischen, ikterischen oder unsachgemäß gelagerten Seren oder Plasmen.
- Thimerosal enthaltende Proben oder Kontrollseren sind mit diesem Kit nicht kompatibel, da sie zu falschen Ergebnissen führen können.
- Nur Standard A darf verwendet werden, um hochkonzentrierte Proben zu verdünnen. Nur das Urin-Verdünnungsmittel darf verwendet werden, um hochkonzentrierte Urinproben zu verdünnen. Verwendung anderer Reagenzien kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Die mit diesem Kit erhaltenen Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für die klinische Diagnostik verwendet werden. Zum Beispiel hat das Auftreten heterophiler Antikörper bei Patienten, die regelmäßig Kontakt mit Tieren oder Tierprodukten haben, ein Störpotential für immunologische Tests. Daher sollte die klinische Diagnose alle Aspekte des Hintergrunds eines Patienten einschließlich der Häufigkeit seiner Exposition gegenüber Tieren/Tierprodukten berücksichtigen, wenn falsche Ergebnisse vermutet werden.

### **VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE**

#### **POTENZIELL INFEKTIÖSES MATERIAL**

Humanserum, das zur Herstellung der Standards und Kontrollen verwendet werden kann, wurde auf das Hepatitis B-Oberflächen-Antigen sowie auf Antikörper gegen HCV und HIV getestet und für nichtreaktiv befunden. Jedoch kann keine Testmethode mit absoluter Sicherheit Freiheit von HIV, HCV und Hepatitis-B-Virus oder anderen infektiösen Erregern garantieren. Die Reagenzien sollten als potentielle Biogefährdungen betrachtet und mit den gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie jede Blutprobe gehandhabt werden.

#### **CHEMISCHE GEFAHREN**

Kontakt mit Reagenzien, die TMB, Wasserstoffperoxid oder Schwefelsäure enthalten, vermeiden. Bei Kontakt mit einem dieser Reagenzien: mit viel Wasser abwaschen. TMB steht im Verdacht, krebserregend zu sein.

#### **PROBENNAHME UND -LAGERUNG**

Serum: Etwa 0,2 ml Serum ist pro Doppelbestimmung erforderlich. Nehmen Sie 4–5 ml Blut in ein entsprechend gekennzeichnetes Röhrchen auf und lassen es gerinnen. Zentrifugieren Sie und entfernen vorsichtig die Serumschicht. Lagerung bei 4 °C bis zu 24 Stunden oder bei -10 °C oder kälter, wenn die Analysen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden sollen.

Plasma: Etwa 0,2 ml Plasma ist pro Doppelbestimmung erforderlich. Probennahme von 4–5 ml Blut in EDTA-Plasmaröhrchen. Lagerung bei 4 °C bis zu 24 Stunden oder bei -10 °C oder kälter, wenn die Analysen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden sollen.

Urin: Etwa 0,2 ml Urin ist pro Doppelbestimmung erforderlich. Sammeln Sie 24-Stunden-Urin in einen Urinbecher. Lagerung bei 4 °C bis zu 24 Stunden oder bei -10 °C oder kälter, wenn die Analysen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden sollen.

Betrachten Sie alle Humanproben als potentielle Biogefährdungen und ergreifen geeignete Schutzmaßnahmen beim Umgang.

#### **PROBENVORBEHANDLUNG**

Serum und Plasma: Dieses Assay ist ein Direktsystem; keine Probenvorbehandlung ist notwendig.

Urin: verdünnen Sie Urinproben vor dem Gebrauch 1:50 mit Urin-Verdünnungsmittel.

Beispiel: Zu 1 ml Urin-Verdünnungsmittel geben Sie 20 µl Urinprobe hinzu.

#### **BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERT REAGENZIEN UND INSTRUMENTE**

- Präzisionspipetten für 50, 100, 150 und 300 µl
- Einweg-Pipettenspitzen
- Destilliertes oder demineralisiertes Wasser
- Plattenschüttler
- Mikrotiterplattenlesegerät mit einem 450-nm-Filtersatz und einer oberen OD-Messgrenze von 3.0 oder höher\* (siehe Assayverfahren Schritt 10).
- *Urin-Verdünnungsmittel – Erforderlich, wenn Urinproben analysiert werden sollen. Für die Verdünnung von Urinproben vor der Messung. Muss separat bestellt werden (MS E-5241; 20 ml)*

## MITGELIEFERTE REAGENZIEN

### AA E-0030 WASH-CONC 10x **Waschpufferkonzentrat - X10**

Inhalt: Eine Flasche Puffer mit nichtionischem Detergens und quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 50 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:10 in destilliertem oder demineralisiertem Wasser verdünnen. Wenn die gesamte Platte verwendet werden soll, 50 ml Waschpufferkonzentrat mit 450 ml Wasser verdünnen.

### AA E-0055 SUBSTRATE **TMB Substrat** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine Flasche Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem DMF- und DMSO-freien Puffer.

Volumen: 16 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

### AA E-0080 STOP-SOLN **Stopplösung** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Ein Fläschchen 1M Schwefelsäure.

Volumen: 6 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

### Standards und Kontrollen – Gebrauchsfertig.

Nachfolgend sind ungefähre Konzentrationen angegeben; die genauen Konzentrationen finden sich auf den Etiketten der Fläschchen:

Kat.-Nr.	Zeichen	Standard	Konzentration	Volumen/Fläschchen
MS E-5201	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">A</span>	<b>Standard A</b>	0 pg/ml	2,0 ml
MS E-5202	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">B</span>	<b>Standard B</b>	15 pg/ml	0,6 ml
MS E-5203	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span>	<b>Standard C</b>	50 pg/ml	0,6 ml
MS E-5204	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">D</span>	<b>Standard D</b>	200 pg/ml	0,6 ml
MS E-5205	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">E</span>	<b>Standard E</b>	500 pg/ml	0,6 ml
MS E-5206	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">STANDARD</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">F</span>	<b>Standard F</b>	1000 pg/ml	0,6 ml
MS E-5251	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">1</span>	<b>Kontrolle 1</b>	Siehe Fläschchenetiketten für Erwartungswert und akzeptablen Bereich!	0,6 ml
MS E-5252	<span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CONTROL</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">2</span>	<b>Kontrolle 2</b>		0,6 ml

Inhalt: Aldosteron in humanserumhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel. Hergestellt durch Dotieren von Serum mit einer definierten Menge von Aldosteron.

Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C

Stabilität: 12 Monate im ungeöffneten Fläschchen oder wie auf dem Etikett angegeben. Einmal geöffnet, sollten die Standards innerhalb von 14 Tagen verwendet oder aliquotiert und eingefroren gelagert werden. Mehrfache Einfrier- und Auftauzyklen sind zu vermeiden.

### MS E-5231 - TIT 96 **Mikrotiterplatte mit Anti-Aldosteron-Kaninchenantikörper beschichtet - herausbrechbare Wells** - gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (12x8), mit polyklonalem Antikörper beschichtet, in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel.

Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.



**MS E-5240****CONJUGATE****Aldosteron-Meerrettichperoxidase(HRP)-Konjugat**

- Inhalt: Aldosteron-Meerrettichperoxidase-Konjugat in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
- Volumen: 15 ml/Fläschchen
- Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
- Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

**TESTVERFAHREN**

Probenvorbehandlung: Serum und Plasma: keine

Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Standards, Kontrollen und Proben sollten jeweils doppelt getestet werden. Sobald das Verfahren begonnen wurde, sollten alle Arbeitsschritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden.

	Verdünnen Sie <b>Urinproben 1:50</b> mit <b>Urinverdünnungsmittel</b> vor Gebrauch.
<b>1.</b>	Stellen Sie die <b>Arbeitslösung</b> vom <b>Waschpuffer</b> her. Verdünnen Sie zu analysierende Urinproben.
<b>2.</b>	Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen. Verschließen Sie den Beutel und legen alle nicht verwendeten Streifen wieder zurück in den Kühlschrank.
<b>3.</b>	Pipettieren Sie <b>50 µl</b> jeder <b>Standard, Kontrolle</b> und <b>Probe (Serum, Plasma oder verdünnter Urin)</b> jeweils zweifach in die entsprechenden Wells.
<b>4.</b>	Pipettieren Sie jeweils <b>100 µl</b> des <b>Aldosteron-HRP-Konjugates</b> in jedes Well. (Wir empfehlen Verwendung einer Mehrkanalpipette.)
<b>5.</b>	<b>1 Stunde</b> bei <b>Raumtemperatur</b> auf einem Plattenschüttler ( $\approx 200$ UPM) inkubieren.
<b>6.</b>	Waschen Sie die Wells <b>3x</b> mit vorbereitetem Waschpuffer ( <b>300 µl/Well</b> für jeden Waschgang) und schlagen die Platte fest auf saugfähigem Papier aus, um sicherzustellen, dass sie trocken ist (Verwendung eines Waschautomaten wird empfohlen).
<b>7.</b>	Pipettieren Sie jeweils <b>150 µl TMB-Substrat</b> in definierten Zeitintervallen in die Wells.
<b>8.</b>	Die Platte <b>15-20</b> Minuten lang auf einem Plattenschüttler bei <b>Raumtemperatur</b> inkubieren. (oder bis Standard A dunkelblaue Farbe für gewünschte OD erreicht).
<b>9.</b>	Zu den gleichen Zeitintervallen wie in Schritt 7 je <b>50 µl Stopplösung</b> in jeden Well pipettieren.
<b>10.</b>	Messen der Platte auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei <b>450 nm</b> innerhalb von 20 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung.
	Wenn die OD die obere Messgrenze überschreitet oder kein 450-nm-Filter verfügbar ist, kann ersatzweise ein 405- oder 415-nm-Filter eingesetzt werden. Die optischen Dichten sind damit niedriger, jedoch hat dies keine Auswirkungen auf die Ergebnisse der Patienten-/Kontrollproben.

**BERECHNUNGEN**

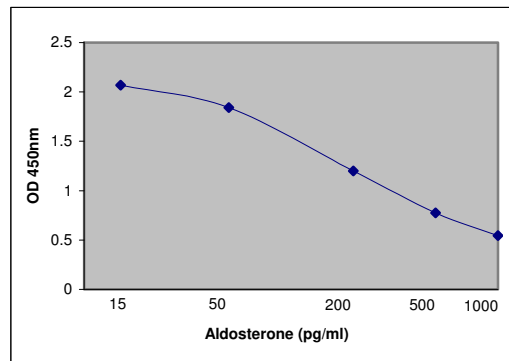
- Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes Standard-Duplikats.
- Zeichnen Sie auf halb-logarithmischem Papier eine Standardkurve mit mittlerer optischer Dichten als Y-Achse und Standardkonzentration als X-Achse. Wenn Immunoassay-Software verwendet wird, wird eine 4-Parameter-Kurve empfohlen.
- Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes unbekanntes Duplikats.
- Lesen Sie die Werte der Serum- und Plasmaproben direkt von der Standardkurve ab.
- Lesen Sie die Werte der Urinproben direkt von der Kurve ab und multiplizieren sie mit einem Faktor von 50. Als Nächstes multiplizieren Sie dies mit dem Volumen des gesammelten 24-Stunden-Urins (in ml), um Werte in pg/24 Stunden zu erhalten. Dividieren Sie schließlich die pg/24-Stunden-Werte durch  $1 \times 10^6$ , um Werte in µg/24 Stunden zu erhalten.
- Wenn eine Serum- oder Plasmaprobe mit mehr als 1000 pg/ml gemessen wird, verdünnen Sie sie mit Standard A auf eine Verdünnung von nicht mehr als 1:8. Das erhaltene Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren. Wenn eine Urinprobe mit mehr als 1000 pg/ml gemessen wird, verdünnen Sie sie mit dem Urin-Verdünnungsmittel auf eine Verdünnung von nicht mehr als 1:2 (aus der ursprünglichen 1:50-Verdünnung). Das erhaltene Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

**TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN**

Calibrator	Mean OD	Value (pg/mL)
A	2.278	0
B	2.167	15
C	1.798	50
D	0.950	200
E	0.485	500
F	0.322	1000
Unknown	1.383	103

**TYPISCHE STANDARDKURVE**

Beispielkurve. **Nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.



**LEISTUNGSMERKMALE**

**EMPFINDLICHKEIT**

Die untere Nachweisgrenze (limit of detection = LoD) wurde durch 60-fache Messung des Blanks und einer Probe mit niedriger Konzentration bestimmt und folgendermaßen berechnet:

$$LoD = \mu_B + 1.645\sigma_B + 1.645\sigma_S,$$

wobei  $\sigma_B$  und  $\sigma_S$  die Standardabweichungen des Blanks und der niedrigen Probe entsprechen und  $\mu_B$  den Mittelwert des Blanks darstellt.

Die untere Nachweisgrenze (LoD) wurde als 14 pg/mL ermittelt.

**SPEZIFITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)**

Die folgenden Verbindungen wurden mit dem "Direct Aldosterone ELISA Kit" auf Kreuzreaktivität getestet, wobei 100% die Kreuzreaktivität von Aldosteron war.

Steroid	% Kreuzreaktivität
Aldosteron	100
11-Deoxycorticosteron	1,1

Die folgenden Steroide wurden getestet, aber zeigten weniger als 0,001% Kreuzreaktivität: Androsteron, Cortison, 11-Deoxycortisol, 21-Deoxycortisol, Dihydrotestosteron, Östradiol, Östriol, Östron und Testosteron.

### REPRODUZIERBARKEIT INNERHALB EINES ASSAYS

Drei Proben wurden jeweils 10-mal mit der gleichen Standardkurve getestet. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Mittelwert	StAbw	VK%
1	78.6	5.89	7.5
2	204	7.75	3.8
3	386	15.05	3.9

### REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN ASSAYS

Drei Proben wurden zehn Mal über einen Zeitraum von vier Wochen untersucht. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Mittelwert	StAbw	VK%
1	18,36	1,72	9,4
2	128,52	12,50	9,7
3	505,77	48,55	9,6

### WIEDERFINDUNG

Dotierte Proben wurden durch Zugabe von definierten Mengen von Aldosteron zu drei Patientenserumproben hergestellt. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Beob. Resultat	Erw. Resultat	Wiederfindung (%)
1. Undotiert	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. Undotiert	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. Undotiert	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

### LINEARITÄT

Zwei Patientenserumproben wurden mit Standard A verdünnt. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind nachfolgend tabellarisch dargestellt:

Probe	Beob. Resultat	Erw. Resultat	Wiederfindung (%)
1	395,1	-	-
1:2	198,6	197,6	100,5
1:4	80,7	98,8	81,7
1:8	44,2	49,5	89,5
2	414,2	-	-
1:2	206,7	207,1	99,8
1:4	103,9	103,6	100,3
1:8	56,7	51,8	109,5

### ERWARTETE NORMALWERTE SERUM/PLASMA

Wie bei allen klinischen Tests sollte jedes Labor Daten sammeln und seinen eigenen Bereich erwarteter Standardwerte erstellen.

Gruppe	Bereich (pg/ml)
Normale Salzzufuhr, liegend	15-133

**REFERENZ-NORMALWERTE URINE**

Wie bei allen klinischen Tests sollte jedes Labor Daten sammeln und seinen eigenen Bereich erwarteter Standardwerte erstellen.

Gruppe	Bereich (µg/24 h)
Normale Salzzufuhr	5-19







Wilson, J.D. und Foster, D.W. Williams Textbook of Endocrinology 8<sup>th</sup> Edition. W.B. Saunders Company, London. p 582, 1992.

**LITERATUR**

- Varsano-Aharon, N., und 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. und 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. und 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, und Edwards, C.R.W., Optimization of a Direct Radioimmunoassay for Plasma Aldosterone. J. Steroid Biochem. 14:481- 487, 1981.
- Corry, D.B, und 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.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

**Symbole:**

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	<b>LOT</b>	Chargennummer	<b>IVD</b>	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	<b>CONT</b>	Inhalt	<b>CE</b>	CE gekennzeichnet
	Achtung	<b>REF</b>	Katalog-Nummer	<b>RUO</b>	Nur für Forschungszwecke