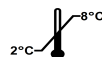


Instructions for use
Aldosterone ELISA

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

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

1. Introduction

1.1 Intended use

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

1.2 Summary and Explanation

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

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

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

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

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

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

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

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

2. PRINCIPLE OF THE TEST

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

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

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

3. WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C - 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.

7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C - 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from the manufacturer.

4. REAGENTS

4.1 Reagents provided

MS E-5231 96 **Microtiterwells**

Contents: 12 x 8 (break apart) strips; 96 wells; Wells coated with anti-aldosterone antibody (polyclonal rabbit)

Standards and Controls - lyophilized

Cat. no.	Component	Concentration	Volume/ Vial
MS E-5201	STANDARD A	0 pg/ml	1.0 ml
MS E-5202	STANDARD B	20 pg/ml	1.0 ml
MS E-5203	STANDARD C	80 pg/ml	1.0 ml
MS E-5204	STANDARD D	200 pg/ml	1.0 ml
MS E-5205	STANDARD E	500 pg/ml	1.0 ml
MS E-5206	STANDARD F	1000 pg/ml	1.0 ml
MS E-5251	CONTROL 1	For control values and ranges please refer to vial label or QC-Report.	1.0 ml
MS E-5252	CONTROL 2		1.0 ml

Conversion: 1 pg/ml corresponds to 2.77 pmol/l

Contents: contain non-mercury preservative.
see "Reagents Preparation"

MS E-5240 **Enzyme Conjugate** - Ready to use

Contents: Aldosterone conjugated to horseradish peroxidase, contain non-mercury preservative.

Volume: 1 x 20 ml

SA E-0055 **Substrate Solution** - Ready to use


Contents: Tetramethylbenzidine (TMB).

Volume: 1 x 25 ml

FR E-0080 **STOP-SOLN** **Stop Solution** - Ready to use

Contents: contains 0.5 M H₂SO₄
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.

Volume: 1 x 14 ml

Hazards
identification: 

H290 May be corrosive to metals.
H314 Causes severe skin burns and eye damage.

FR E-0030 **WASH-CONC 40x** **Wash Solution** - 40x concentrated

Volume: 1 x 30 ml

See "Preparation of Reagents".

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

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Scale paper or semi-logarithmic graph paper or software for data reduction
- **Optional:** Reagents for determination of **Aldosterone in urine** (REF MS U-5200) - **Contents:**
 - 1) **Release Reagent**, 1 vial, 3 ml, ready to use. Containing 1M HCl.
Avoid contact with *Release Reagent*. It may cause skin irritation.
 - 2) **Neutralization Buffer**, 1 vial, 3 ml, ready to use. Containing Tris buffer, pH 8.5.
 - 3) **Dilution Buffer**, 2 vials, 25 ml each, ready to use. Containing PBS.
- Optional: Plastic tubes (e.g. 0.5 - 1.5 ml) for pre-treatment of urine samples

4.3 Storage Conditions

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

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

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

4.4 Reagent Preparation

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

Standards

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

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

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

Controls

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

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

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

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

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

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

4.5 Disposal of the Kit

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

4.6 Damaged Test Kits

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

5. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

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

5.1 Serum / Plasma Samples

5.1.1 Specimen Collection

Serum:

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

Plasma:

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

5.1.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 5 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

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

Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.1.3 Specimen Dilution

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

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

Example:

a) dilution 1:10: 10 µl sample + 90 µl *Standard A* (mix thoroughly)

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

5.2 Urine Samples

Aldosterone concentration can also be determined from urine samples. However, urine samples must be pre-treated before analysis. This will need additional reagents that are not included in this kit, but can be ordered separately (MS U-5200).

5.2.1 Sample Collection

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

5.2.2 Protocol for Urine Sample Pre-treatment

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

5.2.3 Storage of pre-treated urine samples

Pre-treated and diluted urine samples should be capped and may be stored for up to 7 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Samples held for a longer time (up to two months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay.

Thawed samples should be inverted several times prior to testing

5.2.4 Specimen Dilution

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

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

Example:

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

6. ASSAY PROCEDURE

6.1 General remarks

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

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

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

6.3 Calculation of Results

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

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard A (0 pg/ml)	2.11
Standard B (20 pg/ml)	1.90
Standard C (80 pg/ml)	1.55
Standard D (200 pg/ml)	1.15
Standard E (500 pg/ml)	0.76
Standard F (1000 pg/ml)	0.54

6.4 Final Calculation for Urine Samples

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

Example:

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

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

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

7. EXPECTED NORMAL VALUES

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

7.1 Serum/Plasma

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

Healthy Adults	n	Mean (pg/ml)	Median (pg/ml)	2.5 th - 97.5 th Percentile (pg/ml)	Range (min - max) (pg/ml)
Supine position	60	56.14	39.71	14.21 - 156.47	8.58 - 272.30
Upright position	60	77.48	58.00	13.37 - 233.55	12.87 - 358.50

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

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

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

Ratio Aldosterone Renin (pg/ml / pg/ml)

	n	Mean	Median	2.5 th - 97.5 th Percentile
Healthy Adults	89	8.68	5.30	0.52 - 37.83

These values are also valid for serum.

7.2 Urine samples

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

	n	Mean (µg/24 h)	Median (µg/24 h)	2.5 th - 97.5 th Percentile (µg/24 h)	Range (min - max) (µg/24 h)
Healthy adults	8	11.34	9.40	3.31 - 25.09	3.06 - 27.17

These results correspond well to published reference ranges ⁸.

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

8. QUALITY CONTROL

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

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

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

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

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

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

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

9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

For serum and plasma the range of the assay is between 7.75 pg/ml – 1000 pg/ml.

For urine the range of the assay is between 9.81 pg/ml – 1000 pg/ml.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

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

Substance	Cross Reactivity (%)
3 β, 5 α Tetrahydroaldosterone	17.2 %
3 β, 5 β Tetrahydroaldosterone	0.12 %

The following steroids were tested but cross-reacted at less than 0.1%:

androstenedione, androsterone, corticosterone, cortisol, cortisone, 11-deoxycortisol, DHEA, estradiol, estriol, estrone, 17-hydroxyprogesterone, prednisolone, prednisone, progesterone and testosterone.

9.3 Sensitivity

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

	Serum / Plasma	Urine
The Limit of Blank (LoB)	7.75 pg/ml	9.81 pg/ml
The Limit of Detection (LoD)	12.07 pg/ml	16.94 pg/ml
The Limit of Quantification (LoQ)	14.78 pg/ml	23.66 pg/ml

9.4 Reproducibility

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/ml)	CV (%)
Serum 1	40	61.93	4.63
Serum 2	40	247.50	2.02
Serum 3	40	560.33	1.80
Urine 1	40	79.12	5.91
Urine 2	40	229.99	4.85
Urine 3	40	495.82	5.09

9.4.2 Inter Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/ml)	CV (%)
1	80	61.93	10.06
2	80	247.50	5.07
3	80	560.33	4.65
Urine 1	80	79.12	13.92
Urine 2	80	229.99	9.44
Urine 3	80	495.82	9.65

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding aldosterone solutions with known concentrations in a 1:1 ratio.

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

	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Urine 1	Urine 2	Urine 3
Concentration [pg/ml]	94.6	211.6	585.3	70.59	232.55	516.52
Average Recovery [%]	91.3	107.4	98.2	102.1	99.9	95.1
Range of Recovery [%] from	85.1	104.5	91.3	97.4	92.7	91.0
to	96.2	110.9	102.8	108.0	108.2	99.1

9.6 Linearity

	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Urine 1	Urine 2	Urine 3
Concentration [pg/ml]	296.3	406.0	631.2	569.8	655.5	683.7
Average Recovery	101.2	101.6	95.5	98.2	102.7	105.3
Range of Recovery [%] from	96.7	93.6	90.6	95.4	91.0	101.8
to	105.6	109.4	98.6	105.5	111.3	110.6

10. LIMITATION OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

The following substances have no influence on the assay results up to the below stated concentrations.

	Serum	Urine
	Concentration up to	
Haemoglobin	6 mg/ml	
Bilirubin	0.4 mg/ml	
Triglyceride	20 mg/ml	
Cholesterol	2.84 mg/ml	
Total protein	120 mg/ml	
Glucose	10 mg/ml	
Creatinine	0.05 mg/ml	5 mg/ml

10.2 Drug Interferences

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

10.3 High-Dose-Hook Effect

A High-Dose-Hook Effect is not known for competitive assays.

11. LEGAL ASPECTS

11.1 Reliability of Results

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

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

11.2 Therapeutic Consequences

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

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

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

11.3 Liability

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

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.







12. REFERENCES / LITERATURE

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

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

For updated literature or any other information please contact your local supplier

Symbols:

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

1. EINLEITUNG

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

Nur für In-vitro Diagnostik.

1.1 Klinische Bedeutung

Das Steroidhormon Aldosteron ist ein hochwirksames Mineralkortikoid, das in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde gebildet wird. Die Synthese unterliegt der Kontrolle des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)¹ und wird beeinflusst durch die Kaliumkonzentration im Plasma², durch das Peptidhormon ACTH der Hypophyse, sowie durch den Blutdruck, der über drucksensitive Rezeptoren in den Gefäßwänden nahezu aller großen Arterien des Körpers überwacht wird³. Aldosteron bindet an Mineralkortikoid-Rezeptoren und induziert die Transkription Hormon-responsiver Gene. Als Konsequenz dieser Genexpression erhöht Aldosteron den Blutdruck, indem es die Resorption von Natrium aus den distalen Tubuli der Niere in das Blut fördert, die Ausscheidung von Kalium über den Urin vermehrt und das Blutvolumen erhöht.

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

Erkrankung	Aldosteron	Renin
Primärer Hyperaldosteronismus	erhöht	normal
Sekundärer Hyperaldosteronismus	erhöht	erhöht

Weiterhin ermöglicht die Bestimmung von Aldosteron unter dem Einfluss spezieller dämpfender oder stimulierender Maßnahmen eine weitergehende Differenzierung des primären Hyperaldosteronismus in zwei grundlegende Krankheitstypen⁵:

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

Die Unterscheidung beider Krankheitstypen ist essentiell für die weitere Behandlung der Erkrankung. Während Adenome der Nebenniere gut auf operative Maßnahmen ansprechen, kann die Hyperplasie generell besser medikamentös behandelt werden⁶.

Im Rahmen einer Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen kommen zunehmend Medikamente zum Einsatz, die modulierend auf Hormonrezeptoren wirken⁷. Im Rahmen eines solchen Behandlungskonzepts müssen die Auswirkungen auf das RAAS gut untersucht werden, um die Sicherheit und Wirksamkeit dieser Therapeutika sicher zu stellen.

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

2. TESTPRINZIP

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

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

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

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

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

3. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.

- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt beim Hersteller erhältlich.

4. BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

MS E-5231 96 **Microtiterwells**
 Inhalt: 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar); Mit anti-Aldosteron-Antikörper (polyklonal) beschichtet.

Standards und **Controls** - lyophilisiert

Cat. no.	Komponente	Konzentration	Volumen/ Fläschchen
MS E-5201	STANDARD A	0 pg/ml	1,0 ml
MS E-5202	STANDARD B	20 pg/ml	1,0 ml
MS E-5203	STANDARD C	80 pg/ml	1,0 ml
MS E-5204	STANDARD D	200 pg/ml	1,0 ml
MS E-5205	STANDARD E	500 pg/ml	1,0 ml
MS E-5206	STANDARD F	1000 pg/ml	1,0 ml
MS E-5251	CONTROL 1	Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Report.	1,0 ml
MS E-5252	CONTROL 2		1,0 ml

Umrechnung: 1 pg/ml entspricht 2,77 pmol/l

Inhalt: Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
 siehe "Vorbereitung der Reagenzien".

MS E-5240 CONJUGATE **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat) - gebrauchsfertig
 Inhalt: Aldosteron mit Meerrettichperoxidase konjugiert.
 Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
 Volumen: 1 x 20 ml

SA E-0055 SUBSTRATE **Substrate Solution** (Substratlösung) - gebrauchsfertig
 Inhalt: Substratlösung TMB.
 Volumen: 1 x 25 ml

FR E-0030 WASH- CONC 40x **Wash Solution** (Waschlösung)- **40x** konzentriert
 Volumen: 1 x 30 ml
 siehe "Vorbereitung der Reagenzien".

FR E-0080**STOP-SOLN****Stop Solution** (Stopplösung) - gebrauchsfertig

Inhalt:

enthält 0,5 M H₂SO₄

Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.

Volumen:

1 x 14 ml

Mögliche

Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard A* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.**4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien**

- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450 ± 10 nm Filter
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- **Optional:** Reagenz zur Bestimmung von Aldosteron in Urin (**REF** MS U-5200) – **Inhalt:**
 - 1) **Release Reagent**, 1 Fläschchen, 3 ml, gebrauchsfertig. Enthält 1M HCl. Kontakt mit *Release Reagent* vermeiden. Es kann zu Hautirritationen führen.
 - 2) **Neutralization Buffer**, 1 Fläschchen, 3 ml, gebrauchsfertig. Enthält Trispuffer, pH 8,5.
 - 3) **Dilution Buffer**, 2 Fläschchen, je 25 ml, gebrauchsfertig. Enthält RBS.
- Optional: Plastikröhrchen (z.B. 0.5 - 1.5 ml) zur Vorbehandlung von Urinproben

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

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

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

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

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

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

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

Standards

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

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

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

Controls

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

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

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

Wash Solution

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

4.5 Entsorgung des Kits

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

4.6 Beschädigte Testkits

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

5. PROBENVORBEREITUNG

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

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

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

5.1 Serum- /Plasmaproben

5.1.1 Probenentnahme

Serum:

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

Plasma:

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

5.1.2 Probenaufbereitung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 5 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 2 Monaten) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren.

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

5.1.3 Probenverdünnung

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

Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µl Probe + 90 µl *Standard A* (gründlich mischen)

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

5.2 Urinproben

Die Aldosteronkonzentration kann ebenfalls in Urinproben bestimmt werden. Vor der Analyse müssen die Urinproben allerdings vorbehandelt werden. Dazu werden zusätzliche Reagenzien benötigt, die nicht im Kit enthalten sind. Diese Zusatzreagenzien können separat bestellt werden unter REF MS U-5200.

5.2.1 Probenentnahme

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

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

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

Für eine längere Aufbewahrung sollte der Überstand eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden.

5.2.2 Vorbehandlung der Urinproben

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

5.2.3 Aufbewahrung der vorbehandelten und verdünnten Urinproben

Die vorbehandelten und verdünnten Proben sollten gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 7 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 2 Monaten) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren.

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

5.2.4 Probenverdünnung

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

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µl vorbehandelte und vorverdünnte Urinprobe + 90 µl *Dilution Buffer* (gründlich mischen)
(Verdünnungsfaktor = $10 \times 10 = 100$)

6. TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

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

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

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

6.3 Ergebnisermittlung

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

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

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

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard A (0 pg/ml)	2,11
Standard B (20 pg/ml)	1,90
Standard C (80 pg/ml)	1,55
Standard D (200 pg/ml)	1,15
Standard E (500 pg/ml)	0,76
Standard F (1000 pg/ml)	0,54

6.4 Finale Berechnung für Urinproben

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

Beispiel:

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

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

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

7. ERWARTETE WERTE

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

7.1 Serum/Plasma

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

Gesunde Erwachsene	N	Mittelwert (pg/ml)	Median (pg/ml)	2,5 - 97,5 Perzentile (pg/ml)	Bereich (min - max) (pg/ml)
liegende Körperhaltung	60	56,14	39,71	14,21 - 156,47	8,58 - 272,30
stehende Körperhaltung	60	77,48	58,00	13,37 - 233,55	12,87 - 358,50

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

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

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

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

	n	Mittelwert	Median	2,5 - 97,5 Perzentile
Gesunde Erwachsene	89	8,68	5,30	0,52 - 37,83

Diese Werte gelten auch für Serum.

7.2 Urinproben

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

	n	Mittelwert (µg/24 h)	Median (µg/24 h)	2,5 - 97,5 Perzentile (µg/24 h)	Bereich (min - max) (µg/24 h)
Gesunde Erwachsene	8	11,34	9,40	3,31 - 25,09	3,06 - 27,17

Diese Werte stimmen gut überein mit publizierten Referenzbereichen ⁸.

8. QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

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

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

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

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

9. ASSAY CHARAKTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes für Serum und Plasma liegt zwischen 7,75 pg/ml – 1000 pg/ml.

Der Messbereich des Testes für Urin liegt zwischen 9,81 pg/ml – 1000 pg/ml.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Gebrauchsanweisung.

9.3 Sensitivität

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

	Serum / Plasma	Urin
Limit of Blank" (LoB)	7,75 pg/ml	9,81 pg/ml
Nachweisgrenze (LoD)	12,07 pg/ml	16,94 pg/ml
Quantifizierungsgrenze (LoQ)	14,78 pg/ml	23,66 pg/ml

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10. GRENZEN DES TESTS

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

10.1 Interferenzen

Die folgenden Substanzen haben bis zu der angegebenen Konzentration keinen Einfluss auf das Testergebnis.

	Serum	Urine
	Konzentration bis zu	
Hämoglobin	6 mg/ml	
Bilirubin	0,4 mg/ml	
Triglyzeride	20 mg/ml	
Cholesterol	2,84 mg/ml	
Gesamtprotein	120 mg/ml	
Glukose	10 mg/ml	
Kreatinin	0,05 mg/ml	5 mg/ml

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

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

10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein High-Dose-Hook-Effekt ist für kompetitive Assays nicht bekannt.

11. RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

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

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

11.2 Therapeutische Konsequenzen

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

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

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

11.3 Haftung

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







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

12. REFERENZEN / LITERATUR

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

 **Aktuelle Literatur oder weitere Informationen zum Test werden Ihnen auf Anforderung von Ihrem Anbieter gerne zur Verfügung gestellt.**

Symbole:

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