



DCM053-12  
Ed. 01/2021

# ALDOSTERONE ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta dell'Aldosterone in siero umano, plasma umano o in urine

IVD



Vedere etichetta esterna

LOT

2°C 8°C



$\Sigma = 96$  tests

REF DKO053

## DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di Aldosterone in siero umano, plasma umano o in urine.

Il kit Aldosterone ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

## 1. SIGNIFICATO CLINICO

L'aldosterone è un ormone steroideo prodotto dalla corteccia surrenale nella ghiandola adrenale, è il mineralcorticoide più diffuso negli esseri umani, regola l'equilibrio del potassio e del sodio nel sangue.

La secrezione dell'aldosterone sembra essere regolata attraverso il sistema rene-angiotensina.

L'aldosterone agisce sui recettori dei mineralcorticoidi (MR) delle cellule renali aumentando la permeabilità della membrana apicale (lume) al potassio ed al sodio ed attiva le pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, stimola l'idrolisi dell'ATP, il riassorbimento sanguigno di acqua e sodio e l'escrezione del potassio nelle urine. L'aldosterone è coinvolto nella regolazione del bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) nel plasma e dell'equilibrio acido/base.

L'aldosterone è responsabile del riassorbimento di circa 2% del sodio filtrato dai reni.

I livelli di aldosterone nel plasma normalmente variano con la posizione del corpo (in piedi > supino) e con l'assunzione di sali. I livelli di aldosterone del plasma mostrano un ritmo circadiano simile, ma meno marcato, al cortisolo, con picchi al mattino; circa 75% della produzione quotidiana è secreto fra 04:00 e 10:00 ogni giorno. I livelli tendono a diminuire con l'età.

Concentrazioni elevate di aldosterone nel plasma possono occorrere in adenomi, iperaldosteronismo e idiopatie glucocorticoide-sensibili.

La secrezione anormalmente bassa dell'aldosterone si presenta in casi come l'iperplasia adrenale congenita, nefropatia e acidosi tubolare renale.

## 2. PRINCIPIO DEL METODO

Il presente test immunoenzimatico segue le tipiche regole di un saggio competitivo.

La competizione si verifica tra un antigene non marcato (presente nei calibratori e nei campioni) e l'antigene marcato con enzima HRP (coniugato) per un numero limitato di siti di legame degli anticorpi nella piastra. Le fasi di lavaggio rimuovono il materiale non legato. Successivamente viene aggiunto il substrato

enzimatico (TMB). La reazione enzimatica termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di Aldosterone nel campione. Un lettore per micro piastre misura l'assorbanza. Una serie di calibratori è utilizzata per tracciare una curva di calibrazione da cui risalire alla concentrazione di Aldosterone nel campione e nei controlli.

## 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

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

2. Controls (2 flaconi, 1 mL ciascuno)

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

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi

3. Conjugate (1 flacone, 15 mL)

Aldosterone coniugato con perossidasi di rafano (HRP)  
REF DCE002/5302-0

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti Aldosterone adsorbito sulla micropiastra  
REF DCE002/5303-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)  
REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)  
REF DCE005-0

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

0.2M Phosphate buffer pH 7,4 REF DCE0054-0

**3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit**  
Acqua distillata.

**3.3. Materiale e strumentazione ausiliare**  
Dispensatori automatici.  
Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

## Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.  
Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strips da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

## 4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi, ma questi materiali devono essere trattati come potenzialmente infetti. Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300<sup>R</sup> come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300<sup>R</sup> come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.

### Indicazioni di pericolo (Classificazione CLP)

H317 (Skin Sens. 1): può provocare una reazione allergica cutanea

### Consigli di prudenza

P261: evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P272: gli indumenti da lavoro contaminati non devono essere portati fuori dal luogo di lavoro.

P280: Indossare guanti / indumenti protettivi / proteggere gli occhi / il viso.

P302/352 IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua/acqua.

P321: trattamento specifico (vedere istruzioni su questa etichetta)

P333/313: in caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.

- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo permette la determinazione dell'Aldosterone con concentrazioni che vanno da 41,5 pg/mL (LOD) a 2000 pg/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Aldosterone.

## 5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

## 6. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare il kit a 2-8°C; il kit è stabile fino alla data di scadenza indicata in etichetta e nel Certificato di Analisi.

Non utilizzare il kit o i componenti dopo la data di scadenza.

## 7. PROCEDIMENTO

### 7.1. Preparazione di Calibratori e Controlli

Prima dell'uso lasciare su agitatore rotante per almeno 5 minuti.

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni di Aldosterone:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
pg/mL	0	20	80	300	800	2000

I Controlli sono pronti all'uso.

Dopo l'apertura Calibratori e Controlli sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

### 7.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli; in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli; per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione dei cristalli.

### 7.3. Preparazione del Coniugato

Il coniugato è pronto all'uso.

### 7.4. Preparazione del campione

La determinazione di Aldosterone può essere eseguita su siero umano, plasma umano o nelle urine.

– *campioni di siero*

Le provette SST ("Serum Separation Tube") possono essere utilizzate per ottenere il siero senza alcuna interferenza con il test.

– *campioni di plasma*

I campioni di plasma possono essere ottenuti con EDTA, litium eparina e sodio heparin senza alcuna interferenza con il test.

– *campioni di urina*

Per ottenere campioni di urina utilizzare la seguente procedura:

1. pipettare 250 µL di ciascun campione di urina in una provetta di polipropilene;
2. aggiungere 25 µL di HCl 3,2N in ogni provetta e miscelare accuratamente; chiudere e incubare per 24 ore a temperatura ambiente (22-28 ° C) al buio;
3. aggiungere 25 µL di NaOH 3,2 N in ogni provetta e miscelare accuratamente;
4. diluire 100 µL dei campioni neutralizzati con 1400 µL di soluzione fisiologica NaCl 0,9%;
5. utilizzare 50 µL di questa soluzione per eseguire il test come indicato al par. 7.5.

Nota: questo pretrattamento porta ad una diluizione 1:18. Il fattore di diluizione 18 deve essere preso in considerazione per il calcolo della concentrazione finale del campione di urina. Fare riferimento al par. 9.

Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20°C.

I campioni con concentrazione maggiore di 2000 pg/mL non devono essere diluiti ma devono essere refertati come "> 2000 pg/mL".

### 7.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campioni /Controllo	Bianco
Calibratori C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	50 µL		
Campioni/Controllo		50 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a +37°C. Allontanare la miscela di reazione; lavare 3 volte aggiungendo in ogni pozzetto 0,3 mL di wash solution diluita. <b>Nota importante:</b> ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. <b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 20 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

## 8. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Aldosterone per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti

di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

## 9. RISULTATI

### 9.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) e di ogni campione.

### 9.2. Curva di calibrazione

Tracciare il grafico dell'assorbanza in funzione delle concentrazioni dei Calibratori (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>). Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

### 9.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in pg/mL.

**Nota importante:** per i campioni di urina, la concentrazione in pg/mL letta dalla curva di calibrazione deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione 18.

Per convertire la concentrazione ottenuta in "µg Aldosterone/24 ore", applicare la seguente formula:

$$\text{pg/mL} \times \text{Vol (mL) urine 24 h} / 1.000.000 = \text{µg Aldosterone/24 ore}$$

## 10. VALORI DI RIFERIMENTO

Per determinare il range di normalità per i campioni di siero / plasma, sono stati testati campioni di EDTA plasma di 150 adulti maschi e femmine apparentemente sani. La postura dei pazienti (posizione verticale o supina prima della raccolta del campione) è sconosciuta.

Risultato:

Range di normalità siero / plasma
< 14,6 - 174 pg/mL

Per determinare il range di normalità per i campioni di urina, sono stati testati 60 adulti maschi e femmine apparentemente sani; tutti i campioni sono stati pretrattati utilizzando il protocollo indicato al par. 7.4.

Risultato:

Range di normalità urine (24h)
2 - 23 µg/24h

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio

dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

## 11. PARAMETRI CARATTERISTICI

### 11.1. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è stata studiata attraverso il LOB (limite del bianco), il LOD (limite di rilevazione), il LOQ (limite di quantificazione) e la sensibilità analitica (A.S.). La tabella seguente mostra i criteri dello studio e i risultati ottenuti.

	Criteri di studio	Risultato
LOB	Sono stati effettuati 60 replicati del Cal 0, utilizzato come "Blank", in 9 differenti sessioni per 5 giorni	15,3
LOD	Sono stati analizzati 6 campioni sierici bassi in 10 differenti sessioni per 5 giorni	41,5
LOQ	Sono stati analizzati 6 campioni sierici bassi in 10 differenti sessioni per 5 giorni	79,1
A.S.	Sono stati testati 20 replicati di Cal 0 e 5 replicati di Cal 2. A.S. è stata calcolata attraverso regressione lineare.	14,6

### 11.2. Precisione e riproducibilità (Complex Precision)

Per determinare precisione e riproducibilità sono stati utilizzati 5 diversi campioni di siero.

La tabella seguente mostra il valore di "Within Run" e "Total CV%":

Campione	n°	Media (pg/mL)	Within Run CV%	Total CV%
PS1	20	1410,102	5,1%	7,2%
PS2	20	824,239	5,2%	8,4%
PS3	20	483,272	5,7%	8,4%
PS4	20	257,171	6,8%	12,3%
PS5	20	127,102	10,4%	13,9%

### 11.3. Studio del tipo di campione

Lo studio del tipo di campione è stato valutato eseguendo il test in parallelo con siero e plasma appartenenti allo stesso soggetto.

Sono stati usati 20 soggetti diversi.

Sono stati studiati il siero ottenuto con provette SST e il plasma ottenuto con EDTA, litio-eparina e sodio-eparina.

L'interferenza è stata valutata come "significativa" se provoca un bias di concentrazione > 10% tra il campione e il riferimento (EDTA plasma).

La tabella seguente mostra i risultati ottenuti:

Campione	Bias	Interferenza
EDTA plasma	riferimento	/
Siero	9,1%	No
Serum (SST pipes)	6,4%	No
Litio-Eparina plasma	5,1%	No
Sodio-Eparina plasma	7,6%	No

Conclusione: a seguito dello studio, campioni di siero o plasma possono essere utilizzati indifferentemente con questo kit.

I campioni di urina possono essere utilizzati in accordo al par. 7.4.

#### 11.4. Specificità analitica

##### 11.4.1. Sostanze interferenti

Le interferenze per bilirubina coniugata, emoglobina e trigliceridi sono state studiate aggiungendo la sostanza interferente al campione di siero e confrontando la sua concentrazione con il campione non caricato.

Sono stati analizzati campioni con bassa e alta concentrazione di Aldosterone.

L'interferenza è stata valutata come "significativa" se causa un bias di concentrazione >10% tra campione caricato e non caricato.

La tabella seguente mostra i risultati ottenuti:

Sostanza	Conc. dosata	Interferenza
Trigliceridi	600 mg/dL	No
Bilirubina, coniugata	33,1 mg/dL	No
Emoglobina	6,6 mg/dL	No

Conclusione: a seguito dello studio, non vi è alcuna interferenza significativa da bilirubina coniugata, emoglobina e trigliceridi alla concentrazione saggiata.

##### 11.4.2. Cross-reattività

I seguenti cross-reagenti sono stati addizionati a campioni di siero con una concentrazione di Aldosterone bassa e alta. I rispettivi campioni bassi e alti non caricati sono stati utilizzati come riferimento.

L'interferenza è stata valutata come "significativa" se causa un bias di concentrazione >10% tra campione caricato e non caricato.

La tabella seguente mostra i risultati ottenuti:

Interferenti	Conc. dosata	Interferenze
Corticosterone	0,1 µg/mL	No
Androsterone	5 µg/mL	No
Cortisone	0,1 µg/mL	No
Diidrotestosterone (DHT)	0,5 µg/mL	No
Estradiolo	10 µg/mL	No
Estrone	10 µg/mL	No
Estriolo	10 µg/mL	No
Testosterone	0,2 µg/mL	No
DHEA-S	10 µg/mL	No

#### 11.5. Accuratezza

##### 11.5.1. Linearità

Sono stati analizzati 3 coppie di campioni sierici (con concentrazione di Aldosterone bassa e alta) e 11 diluizioni che coprono il range da basso ad alto.

Il dosaggio è lineare sull'intervallo analizzato di 85,8 - 1520,9 pg/mL.

##### 11.5.2. Recupero

Sono stati effettuati tre test utilizzando 3 campioni di siero con una bassa concentrazione di Aldosterone, ciascuno arricchito con il Calibratore 5 in diverse percentuali.

Il recupero medio nei tre campioni è stato del 109%, 102% e 111%.

##### 11.6. Correlazione

– campioni di plasma

126 campioni di EDTA plasma sono stati testati con il kit Dia.Metra Srl Aldosterone ELISA e con il kit IDS - iSYS Aldosterone (metodo di riferimento).

La curva di regressione lineare è:

$$Y = 1,106 * X - 36,06$$

$$r^2 = 0,94$$

– campioni di urine

48 campioni di urina sono stati testati con il kit Dia.Metra Srl Aldosterone ELISA e con un kit ELISA per l'Aldosterone disponibile in commercio (metodo di riferimento). I risultati ottenuti da ciascun test sono stati moltiplicati per il rispettivo fattore di diluizione e convertiti in ng/mL; un'analisi Passing Bablock ha mostrato il seguente risultato:

$$Y = 1,133 * X + 0,8645$$

$$r^2 = 0,87$$

#### 12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

#### BIBLIOGRAFIA

- Himathongkam, T. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 41/1 :153-159, 1975.
- Lun, S., et al, Clin. Chem. 29/2:268-271, 1983.
- Carledge, S. and Lowson, N., Ann. Clin. Biochem. 37:262-278, 2000.
- Sequeira, S. J. Et al., Ann. Clin. Chem. 37/11:1987-1989, 1991.
- Miller, M.A., et al., Clin. Chem. 43/10: 1995-1997, 1997.
- Stabler and Siegel, A.L., Clin. Chem. 37/11: 1987-1989, 1991.
- Vallotton M. B., Clin. Endocrinol. 45: 47-52, 1996.
- Oelkers, W., et al., J. Clin. Endocrinol Metab. 75: 259-264, 1992.
- Ad Dujaili, E.A.S., and Edwards, C. R. W., J. Steroid Biochem. 14: 481-487, 1981.
- Corry, D. B., and Tuck, M. L. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 24: 511-528, 1995
- Raizman E. et al, Clinical Chemistry 61:8, 1022-1027 (2015)
- Funder JW et al, J. Clin. Endocrinol Metab., 93(9):3266-3281 (2008)

Ed. 01/2021

DCM053-12

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)



DCM053-12  
Ed. 01/2021

# ALDOSTERONE ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Aldosterone in human serum, human plasma or urine.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



$\Sigma = 96$  tests

REF DKO053

## INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Aldosterone concentration in human serum, human plasma or urine.

Aldosterone ELISA kit is intended for laboratory use only.

## 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Aldosterone is a steroid hormone produced by the adrenal cortex in the adrenal gland, is the most potent mineralocorticoid in humans, it regulate sodium and potassium balance in the blood.

Aldosterone secretion appears to be stimulated primarily through the renin-angiotensin system.

Acting on mineralocorticoid receptors (MR) on principal cells in the collecting ducts of the kidneys, it increases the permeability of their apical (luminal) membrane to potassium and sodium and activates their basolateral Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pumps, stimulating ATP hydrolysis, reabsorbing sodium (Na<sup>+</sup>) ions and water into the blood, and excreting potassium (K<sup>+</sup>) ions into the urine. Aldosterone regulate plasma bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) levels and its acid/base balance.

Aldosterone is responsible for the reabsorption of about 2% of filtered sodium in the kidneys.

Plasma aldosterone levels normally vary with body position (upright>supine) and salt intake. Overall plasma aldosterone levels show a circadian rhythm which is similar to but less marked than cortisol, with peak levels in the early morning; about 75% of the daily production is secreted between 04:00 am and 10:00 am each day. Age-related levels tend to decline from fetal through adult life.

Abnormally high plasma aldosterone concentrations can occur in adenomas, glucocorticoid-responsive hyperaldosteronism, idiopathic.

Abnormally low aldosterone secretion occurs in a number of conditions including salt-wasting forms of congenital adrenal hyperplasia, nephropathy, and renal tubular acidosis.

## 2. PRINCIPLE

The principle of this enzyme immunoassay test follow the typical competitive binding scenario. Competition occurs between an unlabeled antigen (present in calibrators, control and patient samples) and an

enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited number of antibody binding site on the microwell plate. The washing steps remove unbound materials. After the washing step, the enzyme substrate (TMB) is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the Stop Solution. The intensity of the colour is inversely proportional to the concentration of Aldosterone in the sample. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. A set of calibrators is used to plot a calibration curve from which the amount of Aldosterone in patient samples and controls can be directly read.

## 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

#### 1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

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

#### 2. Controls (2 vial, 1 mL each)

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

Control concentration is indicated on the Certificate of Analysis

#### 3. Conjugate (1 vial, 15 mL)

Aldosterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP) REF DCE002/5302-0

#### 4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with anti aldosterone antibody REF DCE002/5303-0

#### 5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact) REF DCE004-0

#### 6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact) REF DCE005-0

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

0.2M Phosphate buffer pH 7,4 REF DCE054-0



### 3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

### 3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

#### Note

*Store all reagents between 2-8°C in the dark.*

*Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit.*

## 4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300<sup>R</sup> as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.

#### **Hazard statement (Classification under CLP)**

H317 (Skin Sens. 1): may cause an allergic skin reaction

#### **Precautionary statements**

P261: avoid breathing dust / fumes / gas / mist / vapours / spray.

P272: contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.

P280: wear protective gloves / protective clothing / eye protection / face protection.

P302/352 IF ON SKIN: Wash with plenty of water, soap and water.

P321: specific treatment (see instructions on this label)

P333/313: if skin irritation or rash occurs, get medical attention.

- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Aldosterone from 41,5 pg/mL (LOD) to 2000 pg/mL
- The treatment with natural or synthetic steroids can affect blood levels of Aldosterone.

## 5. PRECAUTIONS

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

## 6. STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2-8°C; the kit is stable until the expiry date claimed on the kit label and in the Certificate of Analysis.

Do not use the kit or its components after the expiry date.

## 7. PROCEDURE

### 7.1. Preparation of Calibrators and Controls

Leave on a rotating mixer for at least 5 minutes before using.

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
pg/mL	0	20	80	300	800	2000

The Controls are ready to use.

Once opened, Calibrators and Controls are stable 6 months at 2-8°C.

### 7.2. Preparation of 10X Wash Solution

Dilute the content of the vial "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2÷8°C. In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals, in this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals; for greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL on taking care also transfer the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

### 7.3. Preparation of Conjugate

The Conjugate is ready to use.

### 7.4. Preparation of the Sample

The determination of Aldosterone can be performed in human serum, human plasma or in urine.

#### – serum samples

SST tubes ("Serum Separation Tube") can be used to obtain serum without any interference with the assay.

#### – plasma samples

Plasma samples can be obtained with EDTA, Litium heparin and Sodium heparin without any interference with the assay.

#### – urine samples

To obtain urine samples use the following procedure:

1. pipet 250 µL of each urine sample into a polypropylene tube;
2. add 25 µL of 3.2 N HCl to every tube and mix thoroughly;  
Cap and incubate for 24h at room temperature (22-28°C) in the dark;
3. add 25 µL of 3.2N NaOH to every tube and mix thoroughly;
4. dilute 100 µL of the neutralized samples with 1400 µL of saline solution NaCl 0.9%;
5. use 50 µL of this solution to perform the assay as stated at par. 7.5.

Note: this pretreatment leads to a 1:18 dilution. The dilution factor 18 has to be taken into account for the calculation of the final concentration of the urine sample. Please refer to par. 9.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample connection. Samples with concentration greater than 2000 pg/mL has not to be diluted; such samples has to be reported as "> 2000 pg/mL".

### 7.5. Procedure

- Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes. At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Samples/Control	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	50 µL		
Samples/ Controls		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at +37°C for 1 hour. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. <b>Important note:</b> during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. <b>Automatic washer:</b> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 20 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

## 8. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Aldosterone for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of



kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

## 9. RESULTS

### 9.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) and of each sample.

### 9.2. Calibration curve

Plot the values of absorbance (Em) of the Calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (es: Four Parameter Logistic).

### 9.3. Calculation of Results

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

**Important note:** for urine samples the concentration in pg/ml read from the calibration curve has to be multiplied to the dilution factor 18.

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

$$\text{pg/mL} \times \text{Vol (mL) urine 24 h} / 1.000.000 = \mu\text{g Aldosterone/24h}$$

## 10. REFERENCE VALUES

To determine the normal range for serum / plasma samples, EDTA plasma samples from 150 apparently healthy male and female adults have been tested. The posture of the patients, whether they were upright or supine before the collection of the specimen, is unknown.

Result:

Serum / plasma normal range
< 14,6 - 174 pg/mL

To determine the normal range for urine samples, 60 apparently healthy male and female adults have been tested; all the samples have been pretreated using the protocol stated at par. 7.4.

Result:

Urine normal range (24h)
2 - 23 µg/24h

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

## 11. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

### 11.1. Analytical sensitivity

Analytical sensitivity has been investigated through the LOB (Limit of Blank), LOD (Limit of Detection), LOQ (limit of Quantitation) and Analytical Sensitivity (A.S.).

The table below shows the criteria of the study and the results obtained.

	Criteria	Results (pg/mL)
LOB	60 replicates of Cal 0, used as "Blank", have been investigated in 9 different sessions over 5 days	15,3
LOD	6 low serum samples have been analyzed in 10 different sessions over 5 days	41,5
LOQ	6 low serum samples have been analyzed in 10 different sessions over 5 days	79,1
A.S.	20 replicates of Cal 0 and 5 replicates of Cal 2 have been assayed. A.S. has been calculated by linear regression.	14,6

### 11.2. Precision and reproducibility (Complex Precision)

To determine precision and reproducibility 5 different serum samples have been used.

The table below shows the Within Run and Total CV%.

Sample	n°	Mean (pg/mL)	Within Run CV%	Total CV%
PS1	20	1410,102	5,1%	7,2%
PS2	20	824,239	5,2%	8,4%
PS3	20	483,272	5,7%	8,4%
PS4	20	257,171	6,8%	12,3%
PS5	20	127,102	10,4%	13,9%

### 11.3. Sample type study

Sample type study has been evaluated by performing the assay in parallel with serum and plasma belonging to the same subject.

20 different subjects have been used.

Serum obtained with SST tubes, and plasma obtained with EDTA, lithium-heparin and sodium-heparin have been investigated.

The interference has been evaluated as "significant" if it causes a concentration (bias) >10% between the sample and the reference (EDTA plasma).

The table below shows the results obtained:

Sample	Bias	Interference
EDTA plasma	reference	/
Serum	9,1%	No
Serum (SST pipes)	6,4%	No
Lithium heparin plasma	5,1%	No
Sodium heparin plasma	7,6%	No

Conclusion: following the study, serum and plasma samples can be used indifferently with this kit.

Urine samples can be used according to par. 7.4.

## 11.4. Analytical specificity

### 11.4.1. Interfering substances

Interference by Conjugated Bilirubin, Hemoglobin and Triglycerides has been investigated by adding the interfering substance to the serum sample and by comparing its concentration to the unspiked sample. Samples with low and high concentration of Aldosterone have been analyzed.

The interference has been evaluated as "significant" if it causes a concentration bias >10% between spiked and unspiked sample.

The table below shows the results obtained:

Substance	Conc. assayed	Interference
Triglycerides	600 mg/dL	No
Bilirubin, conjugated	33,1 mg/dL	No
Hemoglobin	6,6 mg/dL	No

Conclusion: following the study, there is no significant interference by Conjugated Bilirubin, Hemoglobin and Triglycerides at the concentration assayed.

### 11.4.2. Cross-reactivity

The following cross-reactants have been spiked in serum samples with low and high Aldosterone concentration. The respective low and high unspiked samples were used as reference.

The interference has been evaluated as "significant" if it causes a concentration bias >10% between spiked and unspiked sample.

The table below shows the results obtained:

Cross-reactant	Conc. assayed	Interference
Corticosterone	0,1 µg/mL	No
Androsterone	5 µg/mL	No
Cortisone	0,1 µg/mL	No
Diidrotosterone (DHT)	0,5 µg/mL	No
Estradiol	10 µg/mL	No
Estrone	10 µg/mL	No
Estriol	10 µg/mL	No
Testosterone	0,2 µg/mL	No
DHEA-S	10 µg/mL	No

## 11.5. Accuracy

### 11.5.1. Linearity

Three tests have been performed using 3 pair of serum (with low and high Aldosterone concentration); 11 dilutions spanning the range low to high have been analyzed.

The assay is linear over the analyzed range (approximately 85,8 - 1520,9 pg/mL).

### 11.5.2. Recovery

Three tests have been performed using 3 serum samples with low aldosterone concentration, each one spiked with the Cal 5 in different percentages.

The mean recovery in the three samples has been 109%, 102% and 111%.

## 11.6. Correlation

### – Plasma samples

126 EDTA plasma samples have been tested with the Dia.Metra Srl Aldosterone ELISA kit and with the IDS - iSYS Aldosterone assay (reference method).

The linear regression curve is:

$$Y = 1,106 \cdot X - 36,06$$

$$r^2 = 0,94$$

### – Urine samples

48 urine samples have been tested with the Dia.Metra Srl Aldosterone ELISA kit and with a commercially available Aldosterone assay (reference method).

The results obtained from each assay were multiplied to the respective dilution factor and converted to ng/mL and a Passing Bablok has been performed; the final result is:

$$Y = 1,133 \cdot X + 0,8645$$

$$r^2 = 0,87$$

## 12. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## BIBLIOGRAPHY

- Himathongkam, T. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 41/1 :153-159, 1975.
- Lun, S., et al, Clin. Chem. 29/2:268-271, 1983.
- Carledge, S. and Lowson, N., Ann. Clin. Biochem. 37:262-278, 2000.
- Sequeira, S. J. Et al., Ann. Clin. Chem. 37/11:1987-1989, 1991.
- Miller, M.A., et al., Clin. Chem. 43/10: 1995-1997, 1997.
- Stabler and Siegel, A.L., Clin. Chem. 37/11: 1987-1989, 1991.
- Vallotton M. B., Clin. Endocrinol. 45: 47-52, 1996.
- Oelkers, W., et al., J. Clin. Endocrinol Metab. 75: 259-264, 1992.
- Ad Dujaili, E.A.S., and Edwards, C. R. W., J. Steroid Biochem. 14: 481-487, 1981.
- Corry, D. B., and Tuck, M. L. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 24: 511-528, 1995
- Raizman E. et al, Clinical Chemistry 61:8, 1022-1027 (2015)
- Funder JW et al, J. Clin. Endocrinol Metab., 93(9):3266-3281 (2008)

Ed. 01/2021

DCM053-12

**Dia.Metra S.r.l.**

Via Pozzuolo 14,  
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)



DCM053-12  
Ed. 01/2021

# ALDOSTERONE ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la aldosterona en suero humano, plasma humano o en orina

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C - 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO053

## USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de aldosterona en suero humano, plasma humano o en orina.

El kit Aldosterona ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

## 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La aldosterona es una hormona esteroidea producida por la corteza suprarrenal en la glándula suprarrenal, es el mineralocorticoide más común en los seres humanos, regula el equilibrio de potasio y de sodio en la sangre. La secreción de aldosterona parece estar regulada por el sistema renina-angiotensina.

La aldosterona actúa sobre los receptores de mineralocorticoides de las células renales, aumentando la permeabilidad de la membrana apical (luz) al potasio y al sodio, y activa las bombas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, estimula la hidrólisis de ATP, la reabsorción sanguínea de agua y sodio, y la secreción de potasio en la orina. La aldosterona está involucrada en la regulación del equilibrio ácido/base.

La aldosterona es responsable de la reabsorción de aproximadamente el 2% del sodio filtrado por los riñones. Los niveles de aldosterona en plasma normalmente varían según la posición del cuerpo (de pie > supino). Los niveles de aldosterona en plasma muestran un ritmo circadiano similar al cortisol, con picos matutinos; aproximadamente el 75% de la producción diaria es secretada entre las 04:00 y las 10:00 cada día. Los niveles tienden a disminuir con la edad. Pueden observarse concentraciones elevadas de aldosterona en plasma, por ejemplo, en adenomas e hiperaldosteronismo, idiopatías sensibles a los glucocorticoides.

La secreción anormalmente baja de aldosterona se presenta en casos como hiperplasia suprarrenal congénita, nefropatía y acidosis tubular renal.

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Método inmunoenzimático competitivo para la determinación de aldosterona. El siguiente método tiene estas características. Después de la adición del antisuero inmovilizado, el conjugado enzima-aldosterona y el suero que contiene el antígeno aldosterona nativo, hay una reacción competitiva entre el antígeno aldosterona nativo y el conjugado

enzima-aldosterona para un número limitado de sitios de enlace inmovilizados. Tras lograr el equilibrio, el conjugado unido a la fase sólida se separa de la fracción de conjugado libre mediante un lavado. La actividad del conjugado unido a la fase sólida es inversamente proporcional a la concentración de antígeno libre (aldosterona).

Utilizando los calibradores con una concentración conocida de antígeno se puede crear una curva en la que es posible interpolar una muestra con concentración desconocida de aldosterona.

## 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

### 3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

#### 1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

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

#### 2. Controles (2 frascos, 1 mL cada uno)

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

La concentración de los Controles se indica en el certificado de análisis (Certificate of Analysis)

REF DCE045/5303-0

#### 3. Conjugado (1 frasco, 15 mL)

Aldosterona conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/5302-0

#### 4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Microplaca con anticuerpo anti aldosterona absorbido

REF DCE002/5303-0

#### 5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

#### 6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

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

REF DCE005-0

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

Tampón fosfato 0,2M pH 7.4

REF DCE054-0

### 3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

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

#### Nota

*Conservar todos los reactivos a 2-8°C, protegidos de la luz.*

*Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.*

#### 4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.

#### **Indicaciones de peligro (Clasificación CLP)**

H317 (Skin Sens. 1): puede provocar una reacción alérgica en la piel

#### **Consejos de prudencia**

P261: evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol

P272: las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo

P280: llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección

P302/352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: lavar con abundante agua/agua

P321: se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones en esta etiqueta)

P333/313: en caso de irritación o erupción cutánea: consultar a un médico

- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.

- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de aldosterona de 41,5 pg/mL (LOD) a 2000 pg/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles hemáticos de aldosterona.

#### 5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de parada. Tanto el sustrato como la Solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

## 6. CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Almacenar el kit y sus componentes a 2-8°C; el kit es estable hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta y en el certificado de análisis.

No usar el kit o sus componentes después de la fecha de vencimiento.

## 7. PROCEDIMIENTO

### 7.1. Preparación de los Calibradores y Controles

Antes del uso, dejar durante al menos 5 minutos en el agitador giratorio.

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones de aldosterona:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
pg/mL	0	20	80	300	800	2000

Los Controles están listo para usar.

Estables 6 meses a 2÷8°C desde la apertura de los frascos.

### 7.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la "Solución de lavado conc. 10X" con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8°C durante al menos 30 días.

En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

### 7.3. Preparación del Conjugado

El Conjugado está listo para usar.

### 7.4. Preparación de la muestra

La determinación de Aldosterona puede realizarse en plasma humano, suero humano o en orina.

- *suero*

Los tubos SST (Serum Separation Tube) no interfieren en los resultados y por lo tanto pueden usarse sin cuidado.

- *plasma*

Las muestras de plasma se pueden obtener con EDTA, heparina de litio y heparina de sodio sin ninguna interferencia con la prueba.

- *orina*

Para obtener muestras de orina usar el siguiente procedimiento:

- poner 250 µL de cada muestra de orina en un tubo de polipropileno;
- añadir 25 µL de HCl 3.2N en cada tubo y mezcle bien; cerrar e incubar durante 24 horas a temperatura ambiente (22-28°C) en la oscuridad;
- añadir 25 µL de NaOH 3.2N a cada tubo y mezcle bien;

- diluir 100 µL de las muestras neutralizadas con 1400 µL de solución salina fisiológica de NaCl al 0,9%;

- use 50 µL de esta solución para realizar la prueba como se indica en el par. 7.5.

Nota: este tratamiento previo lleva a una dilución de 1:18. El factor de dilución 18 debe tenerse en cuenta al calcular la concentración final de la muestra de orina. Consulte el par. 9.

Si la dosificación no se realiza el mismo día de la extracción, conservar la muestra a -20 °C.

Las muestras con una concentración superior a 2000 pg / mL no deben diluirse, pero deben informarse como "> 2000 pg / mL".

### 7.5. Procedimiento

- Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestras /Control	Blanco
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	50 µL		
Muestras /Control		50 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a +37°C. Retirar la mezcla de reacción, lavar 3 veces añadiendo a cada pocillo 0,3 mL de solución de lavado diluida. <b>Nota importante:</b> agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. <b>Lavados automático:</b> si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 20 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			

Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

## 8. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de aldosterona para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) y de cada muestra.

### 9.2. Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia (Em) en función de las concentraciones de los Calibradores (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>). Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

### 9.3. Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en pg/mL.

**Nota importante:** para las muestras de orina, la concentración leída en la curva de calibración en pg/mL debe multiplicarse por el factor de dilución 18. Para convertir la concentración obtenida en "µg de Aldosterona / 24 horas", aplique la siguiente fórmula:

$$\text{pg/mL} \times \text{Vol (mL) orina 24 h} / 1.000.000 = \text{µg Aldosterona/24 horas}$$

## 10. VALORES DE REFERENCIA

Para determinar los valores de referencia para las muestras de suero / plasma, se analizaron muestras de plasma-EDTA de 150 hombres y mujeres adultos aparentemente sanos. Se desconoce la postura del

paciente (posición vertical o supina antes de la colección de muestras).

Resultado:

Valores de referencia suero / plasma
< 14,6 - 174 pg/mL

Para determinar los valores de referencia de las muestras de orina, se analizaron 60 hombres y mujeres adultos aparentemente sanos; todas las muestras se trataron previamente utilizando el protocolo indicado en el par. 7.4.

Resultado:

Valores de referencia orina (24h)
2 - 23 µg/24h

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

## 11. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

### 11.1. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se ha estudiado investigando el LOB (Límite de blanco), LOD (Límite de detección), LOQ (Límite de cuantificación) y la sensibilidad analítica (A.S.).

La siguiente tabla muestra los criterios del estudio y los resultados obtenidos.

	<b>Criterios</b>	<b>Resultados</b>
LOB	Se realizaron 60 réplicas de Cal 0, utilizadas como "blanco", en 5 sesiones diferentes	15,3
LOD	Se analizaron 6 muestras de suero bajo en 10 sesiones diferentes.	41,5
LOQ	Se analizaron 6 muestras de suero bajo en 10 sesiones diferentes.	79,1
A.S.	Se probaron 20 réplicas de Cal 0 y 5 réplicas de Cal 1. A.S. se calculó mediante regresión lineal.	14,6



## 11.2. Precisión y reproducibilidad

La precisión y la reproducibilidad se han evaluado comprobando 5 sueros.

La tabla indica el "Within Run" y el "Total CV%".

Muestra	n°	Media (pg/mL)	Within Run CV%	Total CV%
PS1	20	1410,102	5,1%	7,2%
PS2	20	824,239	5,2%	8,4%
PS3	20	483,272	5,7%	8,4%
PS4	20	257,171	6,8%	12,3%
PS5	20	127,102	10,4%	13,9%

## 11.3. Estudio del tipo de muestra

El uso de plasma con este kit se evaluó realizando la dosificación paralela entre suero y plasma perteneciente al mismo sujeto.

Se utilizaron 20 sujetos diferentes.

Se investigó el plasma obtenido con EDTA, heparina de litio, heparina de sodio y tubos SST.

La interferencia se evaluó como "significativa" si causa una diferencia en la cuantificación (bias) de la muestra entre suero y plasma > 10%.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

Plasma	Bias	Interferencia
EDTA plasma	referencia	/
Suero	9,1%	No
Suero - Tubos SST	6,4%	No
Plasma - Heparina de litio	5,1%	No
Plasma - Heparina de sodio	7,6%	No

Conclusión: después del estudio, las muestras de suero y plasma se pueden usar indistintamente con el kit Aldosterone ELISA.

Las muestras de orina se pueden utilizar de acuerdo con el par. 7.4.

## 11.4. Especificidad analítica

### 11.4.1. Interferencias

Las interferencias del kit con bilirrubina conjugada, hemoglobina y triglicéridos se probaron agregando la sustancia interferente a la muestra de suero y comparando la concentración obtenida con la misma muestra original.

Se analizaron muestras con diferente concentración inicial de Aldosterone.

La interferencia se evaluó como "significativa" si causa una diferencia en la concentración > 10% entre la muestra cargada y descargada

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

Sustancia	Concentración	Interferencia
Triglicéridos	600 mg/dL	No
Bilirrubina conj.	33,1 mg/dL	No
Hemoglobina	6,6 mg/dL	No

Conclusión: después del estudio, no hay una interferencia significativa de bilirrubina conjugada, hemoglobina y triglicéridos en las concentraciones analizadas para el kit Aldosterone ELISA.

### 11.4.2. Reactividad cruzada

Los siguientes reactivos cruzados se agregaron a muestras de suero con una concentración de Aldosterone baja y alta. Las respectivas muestras descargadas se utilizaron como referencia.

La interferencia se evaluó como "significativa" si causa una diferencia en la cuantificación > 10% entre la muestra cargada y descargada.

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

Sustancia	Concentración	Interferencia
Corticosterona	0,1 µg/mL	No
Androsterona	5 µg/mL	No
Cortisona	0,1 µg/mL	No
Diidrotestosterone (DHT)	0,5 µg/mL	No
Estradiol	10 µg/mL	No
Estrona	10 µg/mL	No
Estriol	10 µg/mL	No
Testosterona	0,2 µg/mL	No
DHEA-S	10 µg/mL	No

## 11.5. Exactitud

### 11.5.1. Dilución

Se analizaron tres pares de muestras de suero (con una concentración de Aldosterone baja y alta) y 11 diluciones que cubren el rango bajo a alto.

El ensayo es lineal en el rango analizado de 85,8 - 1520,9 pg/mL.

### 11.5.2. Recuperación

Se realizaron tres test utilizando 3 muestras de suero con una baja concentración de Aldosterone, cada una enriquecida con Calibrator 5 en diferentes porcentajes.

La recuperación promedio en las tres muestras fue de 109%, 102% y 111%.

## 11.6. Correlación

### - plasma

Se analizaron 126 muestras de plasma-EDTA con el kit Aldosterone ELISA Dia.Metra Srl y con el kit de iSYS Aldosterone IDS (método de referencia).

La curva de regresión lineal es:

$$Y = 1,106 * X - 36,06$$

$$r^2 = 0,94$$

### - orina

Se analizaron 48 muestras de orina con el kit Aldosterone ELISA Dia.Metra Srl y un kit ELISA de aldosterone disponible en el mercado (método de referencia). Los resultados obtenidos de cada prueba se multiplicaron por el factor de dilución respectivo y

se convirtieron a ng/mL; un análisis "Passing Bablock" mostró el siguiente resultado:

$$Y = 1,133 * X + 0,8645$$

$$r^2 = 0,87$$

## 12. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

---

### BIBLIOGRAFÍA

1. Himathongkam, T. et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 41/1 :153-159, 1975.
2. Lun, S., et al, Clin. Chem. 29/2:268-271, 1983.
3. Carledge, S. and Lowson , N., Ann. Clin. Biochem. 37:262-278, 2000.
4. Sequeira, S. J. Et al., Ann. Clin. Chem. 37/11:1987-1989, 1991.
5. Miller, M.A., et al., Clin. Chem. 43/10: 1995-1997, 1997.
6. Stabler and Siegel, A.L., Clin. Chem. 37/11: 1987-1989, 1991.
7. Vallotton M. B., Clin. Endocrinol. 45: 47-52, 1996.
8. Oelkers, W., et al., J. Clin. Endocrinol Metab. 75: 259-264, 1992.
9. Ad Dujaili , E.A.S., and Edwards, C. R. W., J. Steroid Biochem. 14: 481-487, 1981.
10. Corry, D. B., and Tuck, M. L. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 24: 511-528, 1995
11. Raizman E. et al, Clinical Chemistry 61:8, 1022-1027 (2015)
12. Funder JW et al, J. Clin. Endocrinol Metab., 93(9):3266-3281 (2008)

Ed. 01/2021

DCM053-12

**Dia.Metra S.r.l.**

Via Pozzuolo 14,  
06038 SPELLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)

<b>DiaMetra</b>	<b>Packaging Information Sheet</b>	<b>Mod. PIS000-1</b>
-----------------	------------------------------------	----------------------

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

**SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING****ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

**Reazione troppo blanda (OD troppo basse)**

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

**Reazione troppo intensa (OD troppo alte)**

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

**Valori inspiegabilmente fuori scala**

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

**CV% intrasaggio elevato**

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

**CV% intersaggio elevato**

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

**ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS****No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

**Too low reaction (too low ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

**Too high reaction (too high ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

**Unexplainable outliers**

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

**ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS****No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

**Reacción escasa (DO demasiado bajas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

**Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**Valores inexplicablemente fuera de escala**

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**CV% intraensayo elevado**

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

**CV% interensayo elevado**

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

**ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS****Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

**Réaction trop faible (DO trop basse)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

**Réaction trop intense (DO trop élevée)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**Valeurs inexplicablement hors plage**

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**CV% intra-essai élevé**

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

**CV% inter-essai élevé**

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs