

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



## Users Manual

# Aldosterone ELISA



DE5298



96

**Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido / Contenu**

1	INTRODUCTION .....	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST .....	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	4
4	REAGENTS .....	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION .....	6
6	ASSAY PROCEDURE .....	7
7	EXPECTED NORMAL VALUES .....	9
8	QUALITY CONTROL .....	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	9
10	LIMITATIONS OF USE .....	11
11	LEGAL ASPECTS .....	11
12	REFERENCES / LITERATURE .....	11
1	EINLEITUNG .....	12
2	TESTPRINZIP .....	12
3	VORSICHTSMABNAHMEN .....	13
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	13
5	PROBENVORBEREITUNG .....	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG .....	16
7	ERWARTETE WERTE .....	18
8	QUALITÄTSKONTROLLE .....	18
9	ASSAY CHARACTERISTIKA .....	18
10	GRENZEN DES TESTS .....	19
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN .....	19
12	REFERENZEN / LITERATUR .....	19
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS .....	20

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

The **DEMEDIATEC Aldosterone ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of aldosterone in serum, 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)<sup>1</sup>, as well as by plasma potassium concentration<sup>2</sup>, the pituitary peptide ACTH, and by the blood pressure via pressure sensitive baroreceptors in the vessel walls of nearly all large arteries of the body<sup>3</sup>. 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<sup>4,8,9</sup>.

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

The measurement of aldosterone in concert with selective suppression and stimulation tests can be used to further differentiate primary aldosteronism into two basic types<sup>5</sup>:

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

This differentiation is vital in the treatment and management of the disease. The adrenal adenomas respond well to surgery whereas hyperplastic disease of the adrenals is generally better managed medically<sup>6</sup>.

In addition, pharmacological modulation of nuclear hormone receptors is a common strategy for the treatment of cardiovascular disease<sup>7</sup>. 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 DEMEDIATEC 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 the package insert 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 to 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 to 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 microtiter plate 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 1 N acidic solution. 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 Material Safety Data Sheets.

Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;  
Wells coated with anti-aldosterone antibody (polyclonal rabbit).
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 vials (lyophilized); 1.0 mL;  
Concentrations: 0 – 20 – 80 – 200 – 500 – 1000 pg/mL. Conversion: 1 pg/mL corresponds to 2.77 pmol/L. See "Reagents Preparation"; Contain non-mercury preservative.
3. **Control Low & High**, 2 vials (lyophilized), 1 mL  
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet. See "Reagents Preparation"; Contain non-mercury preservative.
4. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 20 mL, ready to use,  
Aldosterone conjugated to horseradish peroxidase; Contains non-mercury preservative.
5. **Substrate Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use,  
Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,  
contains 1 N acidic solution, Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated),  
see „Preparation of Reagents“.

**Note:** Additional *Standard 0* 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](#) DE5298URIN) – **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 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 to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 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 2-8 °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 2-8°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 Material Safety Data Sheet.

#### 4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DEMEDITEC 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 4 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 0* 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 0* (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (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 ([REF](#) DE5298URIN).

##### 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 over night 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 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 x 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 with new disposable tips** into appropriate wells.
3. Dispense **150 µL Enzyme Conjugate** into each well.  
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells. Rinse the wells  
**5 x** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well (if an 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!

6. Add **200 µL** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
9. 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 *Stop Solution*.

### 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 IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. 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 0 (0 pg/mL)	2.11
Standard 1 (20 pg/mL)	1.90
Standard 2 (80 pg/mL)	1.55
Standard 3 (200 pg/mL)	1.15
Standard 4 (500 pg/mL)	0.76
Standard 5 (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

$9500 \text{ pg/mL} / 1000 = 9.5 \mu\text{g}/\text{L}$

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

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



## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values. In a study conducted with **serum samples** of apparently normal healthy adults, using the DEMEDITEC Aldosterone ELISA the following values are observed:

Healthy Adults	Valid N	Mean (pg/mL)	Median (pg/mL)	5. Percentile (pg/mL)	95. Percentile (pg/mL)
Supine position	60	62.8	50.9	12.0	157.5
Upright position	60	68.8	52.5	13.3	231.4

These results correspond well to published reference ranges<sup>8,9</sup>.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DEMEDITEC Aldosterone ELISA (DE5298) and the DEMEDITEC Renin ELISA (DE5125) the following **Aldosterone-Renin Ratios** were determined in plasma:

### Ratio Aldosterone Renin (pg/mL / pg/mL)

n	Mean	Median	99 <sup>th</sup> percentile	95 <sup>th</sup> percentile	5 <sup>th</sup> percentile	1 <sup>st</sup> percentile
89	8.68	5.30	49.65	28.06	0.68	0.45

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

n	Mean (µg/24 h)	Median (µg/24 h)	5 <sup>th</sup> Percentile (µg/24 h)	95 <sup>th</sup> Percentile (µg/24 h)
40	11.34	9.40	3.55	23.01

These results correspond well to published reference ranges<sup>8</sup>.

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 calibration 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 certificate 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 DEMEDITEC directly.

## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 5.7 pg/mL – 1000 pg/mL.

### 9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

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

3 β, 5 α Tetrahydroaldosterone:	17.2 %
3 β, 5 β Tetrahydroaldosterone:	0.12 %
Prednisolone:	0.017 %
Cortisol:	< 0.003 %
11-Deoxycortisol:	< 0.003 %
Progesterone:	< 0.003 %
Testosterone:	< 0.002 %
Androstenedione:	< 0.002 %

### 9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DEMEDITEC ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of the *Standard 0* (S0) and was found to be < 5.7 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	20	85.1	9.7
Serum 2	20	210.3	7.4
Serum 3	20	532.2	3.9
Urine 1	20	191.8	5.0
Urine 2	20	391.3	5.6
Urine 3	20	936.8	3.8

#### 9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (pg/mL)	CV (%)
1	40	101.0	9.9
2	40	315.1	8.6
3	40	656.8	9.4
Urine 1	32	386.7	11.5
Urine 2	32	444.0	11.1
Urine 3	32	876.7	10.4

### 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
<b>Concentration [pg/mL]</b>	82.7	96.1	167.9
<b>Average Recovery</b>	112.5	111.0	106.8
<b>Range of Recovery [%]</b>	from	108.2	108.9
	to	114.6	114.5

### 9.6 Linearity

	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Urine 1	Urine 2	Urine 3
<b>Concentration [pg/mL]</b>	600.5	546.2	672.0	559.0	645.0	464.0
<b>Average Recovery</b>	98.4	95.5	96.4	106.8	98.2	98.0
<b>Range of Recovery [%]</b>	from	95.5	87.8	86.0	104.5	87.8
	to	103.0	103.6	102.5	111.6	107.9

## 10 LIMITATIONS 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

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.125 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

### 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

No hook effect was observed in this test.

## 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 DEMEDITEC.

### 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.

## 1 EINLEITUNG

Der **DEMEDIATEC Aldosterone ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Aldosteron in Serum, Plasma 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)<sup>1</sup> und wird beeinflusst durch die Kaliumkonzentration im Plasma<sup>2</sup>, durch das Peptidhormon ACTH der Hypophyse, sowie durch den Blutdruck, der über drucksensitive Rezeptoren in den Gefäßwänden nahezu aller großen Arterien des Körpers überwacht wird<sup>3</sup>. 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<sup>4,8,9</sup>.

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 Krankheitstypen<sup>5</sup>:

- 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 werden<sup>6</sup>.

Im Rahmen einer Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen kommen zunehmend Medikamente zum Einsatz, die modulierend auf Hormonrezeptoren wirken<sup>7</sup>. 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 DEMEDIATEC 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, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- 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 1 N saure Lösung enthält. Saure Lösung 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 Gefahrenstoff-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 die 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 Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

### 4 BESTANDTEILE DES KITS

#### 4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);  
Mit anti-Aldosteron-Antikörper (polyklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen (lyophilisiert), je 1 mL  
Konzentrationen: 0 – 20 – 80 – 200 – 500 – 1000 pg/mL. Umrechnungsfaktor: 1 pg/mL entspricht 2,77 pmol/L. Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Control Low & High** (Kontrollen), 2 Fläschchen (lyophilisiert), je 1 mL  
Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt. Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 20 mL, gebrauchsfertig;  
Aldosteron mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig;  
Substratlösung TMB.
6. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
enthält 1 N saure Lösung, Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
7. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;  
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

**Anmerkung:** Zusätzlicher *Standard 0* 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 DE5298URIN) – **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 PBS.
- 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 bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 bis 8 °C gelagert werden. Die Mikrotiterwells sollten bei 2 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 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 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 Material Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

#### 4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC 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 hämolysierte 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 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 4 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 0* 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 0* gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (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](#) DE5298URIN.

#### 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 2-8 °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 Röhren (z.B. 0.5 - 1.5 mL Plastikröhren, nicht im Kit enthalten) zur Vorbehandlung von Urinproben bereitstellen.
2. Je **25 µL Urinprobe mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Röhren geben.
3. **25 µL Release Reagent** in jedes Röhren 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 Röhren geben, vorsichtig mischen.
6. Je **400 µL Dilution Buffer** in jedes Röhren 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 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 =  $19 \times 10 = 190$ )

## 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.
3. **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.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.  
Wells **5 x** mit **400 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen (mit automatischem Waschsystem) – oder Wells **5 x** mit **300 µL/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 Waschschruttes!
6. **200 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
9. 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 Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. 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 DEMEDITEC ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	2,11
Standard 1 (20 pg/mL)	1,90
Standard 2 (80 pg/mL)	1,55
Standard 3 (200 pg/mL)	1,15
Standard 4 (500 pg/mL)	0,76
Standard 5 (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  
 $9500 \text{ pg/mL} / 1000 = 9.5 \mu\text{g/L}$

Gesamtvolumen des 24-Stunden-Urins = 1.3 L (Beispiel)

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

## 7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt. In einer Studie wurden die **Serumproben** von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DEMEDITEC Aldosteron ELISA folgende Werte:

Gesunde Erwachsene	N	Mittel (pg/mL)	Median (pg/mL)	5. Perzentile (pg/mL)	95. Perzentile (pg/mL)
Liegende Körperhaltung	60	62,8	50,9	12,0	157,5
Stehende Körperhaltung	60	68,8	52,5	13,3	231,4

Diese Werte stimmen gut überein mit publizierten Referenzbereichen<sup>8,9</sup>.

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DEMEDITEC Aldosterone ELISA (EIA 5298) und dem DEMEDITEC Renin ELISA folgende **Aldosteron-Renin-Quotienten** in Plasma:

**Aldosteron-Renin-Quotienten (pg/mL/pg/mL)**

n	Mittelwert	Median	99. Perzentil	95. Perzentil	5. Perzentil	1. Perzentil
89	8,68	5,30	49,65	28,06	0,68	0,45

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

n	Mittelwert (µg/24 h)	Median (µg/24 h)	5. Perzentil (µg/24 h)	95. Perzentil (µg/24 h)
40	11,34	9,40	3,55	23,01

## 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-Zertifikat, 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 der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

## 9 ASSAY CHARACTERISTIKA

### 9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 5,7 pg/mL – 1000 pg/mL.

### 9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### 9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des *Standards 0* (n = 20), beträgt < 5,7 pg/mL.

Die Daten zu:

### 9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

### 9.5 Wiederfindung

### 9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## **10 GRENZEN DES TESTS**

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

### **10.1 Interferenzen**

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,125 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

### **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 Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

## **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 der Firma DEMEDITEC 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**

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de microtitration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Zero Standard	Estándar cero	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante