



Aldosterone

DPC[®]

Coat-A-Count[®] Aldosterone

English

Intended Use: Coat-A-Count Aldosterone is a solid-phase ¹²⁵I radioimmunoassay designed for the quantitative measurement of aldosterone levels in unextracted serum. Coupled with an ethyl acetate extraction procedure, it is also suitable for assaying urine samples. The kit is intended strictly for *in vitro* diagnostic use as an aid in clinical diagnosis.

Catalog numbers: **TKAL1** (100 tubes), **TKAL2** (200 tubes)



The 100-tube kit contains less than 3.5 microcuries (130 kilobecquerels) of radioactive ¹²⁵I aldosterone, and the 200-tube kit contains less than 7 microcuries (259 kilobecquerels).

Summary and Explanation

Normal serum or plasma levels of aldosterone are dependent on the sodium intake and whether the patient is standing or recumbent. High sodium intake will tend to suppress serum aldosterone, whereas low sodium intake will elevate serum aldosterone.

Principle of the Procedure

The Coat-A-Count procedure is a solid-phase radioimmunoassay, based on aldosterone-specific antibody immobilized to the wall of a polypropylene tube. ¹²⁵I-labeled aldosterone competes for a fixed time with aldosterone in the patient sample for antibody sites. The tube is then decanted, to separate bound from free, and counted in a gamma counter. The amount of aldosterone present in the patient sample is determined from a calibration curve.

Reagents to Pipet: 1

Total Incubation Time: 18 Hours at room temperature (15–28°C).

Total Counts at Iodination: approximately 40,000 cpm

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C in a refrigerator designated for incoming radioactive materials. Dispose of in accordance with applicable laws.

Do not use reagents beyond their expiration dates.

Some components supplied in this kit may contain human source material and/or other potentially hazardous ingredients which necessitate certain precautions.

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

Water: Use distilled or deionized water.

Radioactivity

A copy of any radioisotope license certificate (Specific or General) issued to a US customer must be on file with Diagnostic Products Corporation before kits or components containing radioactive material can be shipped. These radioactive materials may be acquired by any customer with the appropriate Specific license. Under a General license these radioactive materials may be acquired only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories and hospitals — and strictly for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving external or internal administration of the radioactive material or its radiation to human beings or other animals. Its acquisition, receipt, storage, use, transfer and disposal are all subject to the regulations and a (General or Specific) license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or a State with which the NRC has entered into an

agreement for the exercise of regulatory control.

Handle radioactive materials according to the requirements of your General or Specific license. To minimize exposure to radiation, the user should adhere to guidelines set forth in the National Bureau of Standards publication on the *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) and in subsequent publications issued by State and Federal authorities.

Wipe up spills promptly and decontaminate affected surfaces. Avoid generation of aerosols. Dispose of solid radioactive waste according to license requirements. General licensees (holders of NRC Form 483) may dispose of solid radioactive waste as nonradioactive waste, after removing labeling. Specific licensees (NRC Form 313) should refer to Title 10, Code of Federal Regulations, Part 20. Licensees in Agreement States should refer to the appropriate regulations of their own state. General licensees may dispose of liquid radioactive waste of the type contained in this product through a laboratory sink drain. Licensees must remove or deface labels from empty containers of radioactive materials before disposal of solid waste. Specific licensees may dispose of small quantities of liquid radioactive waste of the type used in this product through a laboratory sink drain. Refer to the appropriate regulations applicable to your laboratory.

Materials Supplied: Initial Preparation

Aldosterone Ab-Coated Tubes (TAL1)

Polypropylene tubes coated with antibodies to aldosterone and packaged in zip-lock bags. Store refrigerated and protected from moisture, carefully resealing the bags after opening. Stable at 2–8°C for one year from the date of manufacture. Color: light brown.

TKAL1: 100 tubes. **TKAL2:** 200 tubes.

¹²⁵I Aldosterone (TAL2)

Lyophilized iodinated aldosterone. Reconstitute each vial by adding a measured **110 mL** of distilled or deionized water. Let stand for 10 minutes, then mix by *gentle* inversion. Stable at 2–8°C for 30 days after reconstitution, or until the

expiration date marked on the label.

TKAL1: 1 vial. **TKAL2:** 2 vials.

Aldosterone Calibrators (ALC3–9)

Seven vials, labeled A through G, of lyophilized processed human serum. *At least 30 minutes prior to use*, reconstitute the zero calibrator **A with 6.0 mL** of distilled or deionized water, and each of the remaining calibrators **B through G with 3.0 mL** of distilled or deionized water. Use volumetric pipets and mix by *gentle* swirling. Store frozen: stable at –20°C for 30 days after reconstitution. For maximum integrity, aliquot and freeze.

TKAL1: 1 set. **TKAL2:** 1 set.

The reconstituted calibrators contain, respectively, 0, 25, 50, 100, 200, 600 and 1,200 picograms of aldosterone per milliliter (pg/mL) in processed human serum; equivalently: 0, 69, 139, 278, 555, 1,665 and 3,300 picomoles per liter (pmol/L).

Materials Required But Not Provided

Gamma counter — compatible with standard 12x75 mm tubes

Vortex mixer

Reagent Preparation

Distilled or deionized water

Graduated cylinder: 110 mL

Volumetric pipets: 3.0 mL and 6.0 mL

Urine Extraction

See Sample Preparation: Urine, below.

Radioimmunoassay

Plain 12x75 mm polypropylene tubes — for use as NSB tubes, available from DPC
Micropipets: 200 µL and 1.0 mL.

Foam decanting rack — available from DPC.

Logit-log graph paper — available from DPC (catalog number: ZP797)

A tri-level, human serum-based immunoassay control, containing aldosterone as one of over 25 constituents, is available from DPC (catalog number: CON6).

Specimen Collection

Serum:

The patient need not be fasting, and no special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture⁶ into plain or heparinized tubes, noting the time of collection, and separate the serum from the cells by centrifugation.

Heparinized plasma yields results which are comparable to serum, but EDTA plasma yields results which are on average about 15% higher.

The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Hemolyzed samples may indicate mistreatment of a specimen before receipt by the laboratory; hence the results should be interpreted with caution.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. Coat-A-Count Aldosterone has not been tested with all possible variations of tube types. Consult the section on Alternate Sample Types for details on tubes that have been tested.

Volume Required: 200 μ L per tube.

Storage: 2–8°C for 7 days, or 2 months frozen at –20°C.

Before assay, allow the samples to come to room temperature and mix by *gentle* swirling or inversion. Aliquot, if necessary, to avoid repeated thawing and freezing. Do not attempt to thaw frozen specimens by heating them in a waterbath.

Urine:

Obtain a 24-hour sample, keeping the specimen refrigerated during collection. Record the total volume. Unless the analysis is to be carried out immediately, reserve a well-mixed aliquot after adding 1 gram of boric acid per 100 mL urine.

Volume Required: 0.25 mL urine (for extraction procedure).

Storage: 7 days at 2–8°C or one month frozen at –20°C.

Sample Preparation: Urine

Precautions: Ethyl acetate is a volatile, flammable organic solvent. Conduct the

evaporation step under a fume hood equipped with an explosion-proof exhaust fan. Avoid open flames, and do not pipet by mouth. The ethyl acetate must be of at least spectrophotometric grade.

- 1 Label one glass or polypropylene tube (uncoated) for each urine sample.

The tubes should have tight-fitting caps and be able to withstand centrifuging at 1500xg

- 2 Pipet **250 μ L** of each urine sample into the appropriate tube.

If the sample is cloudy or if a precipitate has formed, first centrifuge the urine and work with the supernatant.

- 3 **Hydrolysis:** Add **25 μ L** of 3.2 N HCl (not supplied) to every tube. Cap securely and incubate for 24 hours at room temperature *in the dark*.

3.2 N HCl can be made by adding 1.0 mL concentrated HCl (12N) to 2.75 mL distilled water. Do not add water to concentrated acid, since this may cause splattering.

- 4 **Extraction:** Add **2.5 mL** ethyl acetate (not supplied) to every tube. Cap securely.

- 5 Mix by gentle inversion for **60 minutes**.

Use a mechanical rotator set at 15–20 revolutions-per-minute.

- 6 Centrifuge for **5 minutes** at about 1500xg, to separate the two layers.

Any sample partially emulsified should be shaken vigorously and centrifuged again.

- 7 **Evaporation:** Transfer exactly **50 μ L** of the upper (ethyl acetate) phase cleanly into one plain (uncoated) 12x75 mm polypropylene tube.

Suitable tubes are available from DPC. (Do not use polystyrene or antibody-coated tubes.) Pipet directly to the bottom of the tube using a positive-displacement micropipet. The remainder of the ethyl acetate phase may be retained for future use simply by freezing the extraction tube at –20°C; it is not necessary to separate the ethyl acetate phase from the aqueous phase.

- 8 Evaporate to complete dryness under a gentle stream of nitrogen at 37°C.
- 9 Add **0.5 mL** of the zero calibrator A. Thoroughly resuspend the extract by vortexing.

Proceed with the radioimmunoassay procedure, as described below. If not assayed immediately, the extracts should be stored tightly capped at –20°C, either dry (following step 8) or resuspended. Volumes may be scaled up, if desired, providing the proportions specified in the extraction procedure remain unchanged.

Radioimmunoassay Procedure

A single calibration curve provides the basis for determining aldosterone concentrations in serum and in urine. Accordingly, both urinary extracts and unextracted serum samples may be processed in the same assay. The calibrators, once reconstituted, are ready to use; only urine samples must be subjected to extraction, as described in the Sample Preparation: Urine section. All components must be at room temperature (15–28°C) before use.

- 1 **Plain Tubes:** Label four plain (uncoated) 12x75 mm polypropylene tubes T (total counts) and NSB (nonspecific binding) in duplicate.

Because nonspecific binding in the Coat-A-Count procedure is characteristically low, the NSB tubes may be safely omitted without compromising accuracy or quality control.

Coated Tubes: Label fourteen Aldosterone Ab-Coated tubes A (maximum binding) and B through G in duplicate. Label additional antibody-coated tubes, also in duplicate, for controls and patient samples.

Calibrators	pg/mL	ng/dL	pmol/L
A (MB)	0	0	0
B	25	2.5	69
C	50	5	139
D	100	10	278
E	200	20	555
F	600	60	1,665
G	1,200	120	3,300

- 2 Pipet **200 µL** of the zero calibrator A into the NSB and A tubes, and **200 µL** of each remaining calibrator, control and patient sample (serum) into the tubes prepared. Pipet **200 µL** of each urinary *extract* into appropriately labeled tubes.

Patient samples expected to contain aldosterone concentrations greater than the highest calibrator (1,200 pg/mL) should be diluted in the zero calibrator before assay.

It is good practice to use a disposable-tip micropipet, changing the tip between samples, in order to avoid carryover contamination.

- 3 Add **1.0 mL** of ¹²⁵I Aldosterone to every tube. Vortex briefly and gently.

Laboratories equipped with a reliable pipettor-diluter may handle steps 2 and 3 simultaneously, but care should be taken to avoid carryover from sample to sample. No more than 10 minutes should elapse during the dispensing of the tracer. Set the T tubes aside for counting (at step 6); they require no further processing.

- 4 Incubate for **18 hours** at room temperature (15–28°C).

- 5 Decant thoroughly.

Removing all visible moisture will greatly enhance precision. Using a foam decanting rack, decant the contents of all tubes (except the T tubes) and allow them to drain for 2 or 3 minutes. Then strike the tubes sharply on absorbant paper to shake off all residual droplets.

- 6 Count for **1 minute** in a gamma counter.

Calculation of Results

To obtain results in terms of concentration from a logit-log representation of the calibration curve, first calculate for each pair of tubes the average NSB-corrected counts per minute:

Net Counts = (Average CPM) minus (Average **NSB** CPM)

Then determine the binding of each pair of tubes as a percent of maximum binding (MB), with the **NSB**-corrected counts of the A tubes taken as 100%:

Percent Bound = (Net Counts / Net **MB** Counts) × 100

(The calculation can be simplified by omitting the correction for nonspecific binding; samples within range of the calibrators yield virtually the same results when Percent Bound is calculated directly from Average CPM.)

Using logit-log graph paper, plot Percent Bound on the vertical (probability) axis against Concentration on the horizontal (logarithmic) axis for each of the nonzero calibrators, and draw a straight line approximating the path of these points. Results for the unknowns may then be read from the line by interpolation.

Urine Samples: The result in "pg/mL" as read from the calibration curve must be multiplied by 100 to obtain the aldosterone concentration, in picograms per milliliter, of the original, unextracted urine sample. Divide this figure by 1,000, then multiply by the total volume *in liters*; to report the 24-hour aldosterone output in micrograms per day. (A correction factor of 100 is used because the urine samples are twice diluted 1-in-10: first by extracting 0.25 mL urine into 2.5 mL ethyl acetate, then by reconstituting the residue of 0.05 mL in 0.5 mL of zero calibrator. The addition of hydrochloric acid during the hydrolysis step has no effect on the dilution.)

Data Reduction Parameters

It is good practice to inspect results for agreement within replicates, and to construct a graph of the calibration curve (even if the calculations are handled by computer) as a visual check on the appropriateness of the transformation used and as a way to detect deviant calibration points. We also recommend keeping track of these data reduction parameters:

T = Total Counts (as counts per minute)

%NSB = $100 \times (\text{Average NSB Counts} / \text{Total Counts})$

%MB = $100 \times (\text{Net Counts} / \text{Total Counts})$

And the 20, 50 and 80 percent "intercepts," where

20% = Concentration at 20 Percent Bound, etc.

Note that other approaches, e.g. a sound implementation of the 4-parameter logistic, are also acceptable. See Dudley RA, et al.

Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Example Run: For illustration only, not for calculating results from another run. (See "Example Run" table.)

Quality Control

Controls or serum pools with at least two aldosterone concentration levels — low and high — should routinely be assayed as unknowns.

Report patient results only if the control results for the assay meet your laboratory's established criteria for acceptability.

It is good laboratory practice to record for each assay the lot numbers of the components used, as well as the dates when they were first reconstituted or opened. We also recommend charting control results from day to day — as described, for example, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Note that repeat samples can serve as a valuable additional tool for monitoring interassay precision, and that pairs of control tubes can be spaced throughout the assay to help verify the absence of significant drift.

Solvent Blanks: For reliable results, the ethyl acetate must be of at least spectrophotometric grade and the nitrogen source, if used, must not contaminate the evaporation tubes with oil or moisture. (The use of a trap containing calcium sulfate will help prevent such contamination.) As a check on the purity of these reagents, which are not supplied with the kit, we recommend processing a "solvent blank" periodically. This involves extracting and assaying distilled or sterile water, in the manner prescribed for urine samples, to verify that it yields an apparent aldosterone concentration of essentially zero, that is, below the detection limit of the assay.

Expected Values

The following aldosterone levels for serum (or plasma) are based on normal sodium intake. Note that normal serum or plasma levels of aldosterone are dependent on the sodium intake and whether the patient is standing or recumbent. High sodium intake will tend to suppress serum

aldosterone, whereas low sodium intake will elevate serum aldosterone.

Standing	4–31 ng/dL
Recumbent	1–16 ng/dL

The following urinary aldosterone levels have been reported.

Normal Diet	6–25 µg/day
Low Salt	17–44 µg/day
High Salt	0–6 µg/day

A complete investigation of aldosterone pathophysiology must also include assessment of plasma renin/angiotensin activity.

Laboratories should consider these results as *guidelines only*. Each laboratory should establish its own reference ranges.

Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the Coat-A-Count Aldosterone kit's performance. Aldosterone results in the sections below are expressed as pg/mL. Unless otherwise specified, all results were generated on serum samples.

Conversion Factors:

pg/mL $\times$ 2.775 $\rightarrow$ pmol/L

pg/mL $\div$ 10 $\rightarrow$ ng/dL

Calibration Range: 25 – 1,200 pg/mL

Analytical Sensitivity: 11 pg/mL.

Intraassay Precision (Within-Run):

Statistics were calculated for each of six samples from the results of twenty pairs of tubes in a single assay. (See "Intraassay Precision" table.)

Interassay Precision (Run-to-Run):

Statistics were calculated for each of six samples from the results of pairs of tubes in 20 different assays. (See "Interassay Precision" table.)

Linearity: Samples were assayed under various dilutions. (See "Linearity" table for representative data.)

End-of-Run Effect: None up to approximately 400 tubes. (See "End-of-Run Effect" table.)

Recovery: Samples spiked 1 to 19 with three aldosterone solutions (4,576, 8,347

and 15,071 pg/mL) were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

Specificity: The antiserum for the Coat-A-Count Aldosterone kit is very specific for aldosterone, with an extremely low crossreactivity to other compounds that might be found in patient samples. Crossreactivities were calculated on a weight-per-weight basis at approximately 50% binding. (See "Specificity" table for representative data.)

Bilirubin: Presence of bilirubin in concentrations up to 200 mg/L has no effect on results, within the precision of the assay.

Hemolysis: Presence of packed red blood cells in concentrations up to 30 µL/mL has no effect on results, within the precision of the assay.

Lipemia: The 600 pg/mL calibrator was serially diluted with each of two lipemic serum pools, causing the degree of lipemia to increase as the aldosterone concentration (due primarily to the calibrator) decreases. The dilutions were assayed by the Coat-A-Count Aldosterone procedure along with the unspiked lipemic pools. The results show excellent recoveries, even in the presence of severe lipemia.

Alternate Sample Type: To determine whether anticoagulants interfere with the assay, blood was collected from 47 volunteers into plain, heparinized and EDTA vacutainer tubes. All samples were assayed by the Coat-A-Count Aldosterone procedure. The results were subjected to linear regression analysis.

(Heparin) = 0.96 (Serum) – 3.0 pg/mL
 $r = 0.978$

Means:
175 pg/mL (Heparin)
185 pg/mL (Serum)

(EDTA) = 1.04 (Serum) + 22 pg/mL
 $r = 0.985$

Means:
214 pg/mL (EDTA)
185 pg/mL (Serum)

The results show that serum and heparinized plasma yield comparable results, whereas EDTA plasma yields results which are on average about 15% higher.

Protein Effect: To simulate various protein concentrations, experiments were

performed in which 2.0 mL aliquots of a human serum pool were freeze-dried and then reconstituted with various volumes of water (1.0, 1.3, 2.0, 3.0 and 4.0 mL). Each reconstituted aliquot was then assayed by the Coat-A-Count Aldosterone procedure. Note that aliquots reconstituted with half the original volume represent an extremely high protein concentration, on the order of 14 g/dL. (The factor to correct for reconstitution volume is tabulated below.) These results indicate that even wide variations in protein content have relatively little effect on the Coat-A-Count Aldosterone assay. (See "Protein Effect" table.)

Method Comparison 1: Two hundred and thirty-six serum samples, with aldosterone concentrations ranging from 27 to 860 pg/mL, were simultaneously assayed by the Coat-A-Count Aldosterone current procedure (18-hour incubation at room temperature) and by its predecessor (3-hour incubation at 37°C). (see "Method Comparison 1" graph) By linear regression.

(Current) = 1.0 (Previous) – 8.4 pg/mL
r = 0.985

Means:

130 pg/mL (Current)
138 pg/mL (Previous)

Method Comparison 2: In another study, 84 urine samples, with aldosterone concentrations ranging from 26 to 228 pg/mL, were simultaneously assayed by the Coat-A-Count Aldosterone current procedure (18-hour incubation at room temperature) and by its predecessor (3-hour incubation at 37°C). (see "Method Comparison 2" graph) By linear regression.

(Current) = 1.0 (Previous) + 5.9 pg/mL
r = 0.953

Means:

85 pg/mL (Current)
77 pg/mL (Previous)

References

1) Mayes D, et al. Radioimmunoassay for plasma aldosterone. J Clin Endocrinol Metab 1970;30:682-5. 2) Demers LM, et al. Plasma and urinary aldosterone measurement in healthy subjects with a radioimmunoassay kit not requiring chromatography. Clin Biochem 1976;9(5):243-6. 3) Tan SY, et al. Direct non-chromatographic radioimmunoassay of aldosterone: validation of a commercially available kit and observations on age-related changes in concentrations in plasma. Clin Chem 1978;24:1531-3. 4) Walsh P, et al. Non-chromatographic radioimmunoassay procedure for urinary aldosterone. Clin Chem 1979;25:1226-9. 5) Kubasik N, et al. Evaluation of a new commercial radioassay kit for aldosterone using an iodinated tracer. Clin Biochem 1979;12:59-61. 6) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved standard. 4th ed. NCCLS Document H3-A4, Wayne, PA: NCCLS, 1998.

Technical Assistance

In the United States, contact DPC's Technical Services department.
Tel: 800.372.1782, 310.645.8200
Fax: 310.645.9999. To place an order:
Tel: 800.372.1782. Fax: 800.234.4372.
Outside the United States, contact your National Distributor.

The Quality System of Diagnostic Products Corporation is registered to ISO 13485:2003.

Tables and Graphs

Example Run

Tube ¹	Duplicate CPM ²	Average CPM ³	Net CPM ⁴	Percent Bound ⁵	Aldosterone pg/mL ⁶
T ⁷	39,951 39,910	39,931			
NSB⁸	498 586	542	0		
A (MB) ⁹	20,576 20,003	20,290	19,748	100%	0
B	17,440 17,750	17,595	17,053	86%	25
C	15,591 16,105	15,848	15,306	78%	50
D	13,317 12,983	13,150	12,608	64%	100
E	9,998 10,177	10,088	9,546	48%	200
F	5,468 5,251	5,360	4,818	24%	600
G	3,613 3,419	3,516	2,974	15%	1,200
Unknowns ¹⁰					
X1	15,808 15,640	15,724	15,182	77%	51
X2	11,370 11,826	11,598	11,056	56%	143
X3	6,697 6,640	6,669	6,127	31%	433

Quality Control Parameters:¹¹

T⁷ = 39,931 cpm

%NSB⁸ = 1.4%

%MB⁹ = 49%

20% Intercept¹² = 810 pg/mL

50% Intercept = 184 pg/mL

80% Intercept = 42 pg/mL

Intraassay Precision (pg/mL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	65	3.5	5.4%
2	174	5.5	3.2%
3	243	8.2	3.4%
4	448	11.7	2.6%
5	575	16.8	2.9%
6	813	19.0	2.3%

Interassay Precision (pg/mL)

	Mean ¹	SD ²	CV ³
1	58	9.1	15.7%
2	59	7.7	13.1%
3	162	10.5	6.5%
4	226	15.3	6.8%
5	447	19.4	4.3%
6	548	21.0	3.8%

Linearity (pg/mL)

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	16 in 16 ⁵	635	—	—
	8 in 16	319	318	100%
	4 in 16	167	159	105%
	2 in 16	92	79	116%
	1 in 16	40	40	100%
2	16 in 16	642	—	—
	8 in 16	331	321	103%
	4 in 16	184	161	114%
	2 in 16	95	80	119%
	1 in 16	44	40	110%
3	16 in 16	750	—	—
	8 in 16	378	375	101%
	4 in 16	210	188	112%
	2 in 16	104	94	111%
	1 in 16	51	47	109%
4	16 in 16	1,008	—	—
	8 in 16	540	504	107%
	4 in 16	292	252	116%
	2 in 16	135	126	107%
	1 in 16	73	63	116%

Specificity

Compound ¹	Percent Crossreactivity ²
Aldosterone	(100%)
Androstendione	ND
Androsterone	0.0005%
Corticosterone	0.002%
18-OH-Corticosterone	0.033%
Cortisol	ND
Cortisone	0.0003%
11-Deoxycorticosterone	0.006%
11-Deoxycortisol	0.0004%
Dexamethasone	0.00005%
DHEA	0.0005%
Estradiol	ND
Estriol	ND
Estrone	ND
Fludrocortisone	ND
Prazosin HCl	ND
Prednisolone	0.00003%
Prednisone	ND
Pregnenolone	ND
Progesterone	0.007%
17 α -Hydroxyprogesterone	ND
Spironolactone	0.06%
Testosterone	ND

ND: not detectable³

End-of-Run Effect (pg/mL)

	Tubes ¹ 65–78	Tubes 173–186	Tubes 281–294	Tubes 389–402
1	61	67	65	60
2	70	61	58	57
3	75	65	71	65
4	170	179	174	174
5	237	230	245	242
6	468	453	466	458
7	570	553	563	575

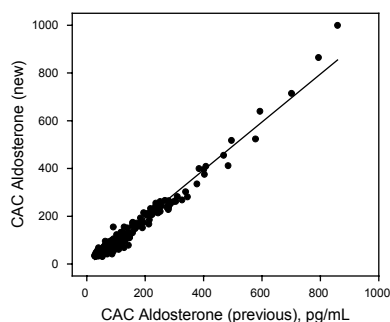
Recovery (pg/mL)

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	—	24	—	—
	A	249	252	99%
	B	439	440	100%
	C	847	776	109%
2	—	29	—	—
	A	231	256	90%
	B	382	445	86%
	C	753	781	96%
3	—	39	—	—
	A	232	266	87%
	B	391	454	86%
	C	767	791	97%
4	—	80	—	—
	A	305	305	100%
	B	487	493	99%
	C	748	830	90%
5	—	158	—	—
	A	419	379	111%
	B	558	567	98%
	C	845	904	93%

Protein Effect

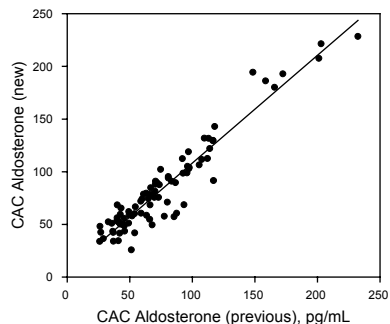
Expt. ¹	Factor ²	Approx. g/dL ³	Observed ⁴	Expected ⁵	% O/E ⁶
1	2.00×	~ 14	384	364	105%
	1.50×	~ 10.5	294	273	108%
	1.00×	~ 7.0	182	—	(100%)
	0.67×	~ 4.7	118	122	97%
	0.50×	~ 3.5	85	91	93%
2	2.00×	~ 14	936	790	118%
	1.50×	~ 10.5	653	593	110%
	1.00×	~ 7.0	395	—	(100%)
	0.67×	~ 4.7	235	265	89%
	0.50×	~ 3.5	159	198	80%

Method Comparison 1



(Current) = 1.0 (Previous) – 8.4 pg/mL
r = 0.985

Method Comparison 2



(Current) = 1.0 (Previous) + 5.9 pg/mL
r = 0.953

Deutsch. Example Run: ¹Röhrchen, ²Duplikat CPM, ³Mittelwert CPM, ⁴Netto CPM, ⁵Prozent Bindung, ⁶Ca. Aldosteron, pg/ml, ⁷Qualitätskontrollparameter, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹20% Intercept. **Intraassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Interassay Precision:** ¹Mittelwert, ²SD (Standardabweichung), ³CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E, ⁵16 in 16. **Recovery:** ¹Lösung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E. **Specificity:** ¹Verbindung, ²% Kreuzreaktivität, ³NN: Nicht nachweisbar. **End-of-Run-Effect:** ¹Röhrchen. **Protein Effect:** ¹Experiment, ²Faktor, ³Gemessene Konzentration, ⁴Beobachtet (B), ⁵Erwartet (E), ⁶% B/E. **Method Comparison:** Aldosterone: Aldosteron, Current: Aktuell, Previous: Vorgänger.

Español. Example Run: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Media CPM, ⁴CPM Netas, ⁵Porcentaje de unión, ⁶Aldosterone, aprox., pg/ml, ⁷Parámetros del control de calidad, ⁸Total,

⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹Corte al 20%. **Intraassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Media, ²DS, ³CV. **Linearity:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵16 en 16. **Recovery:** ¹Solución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Compuesto, ²% Reacción cruzada, ³ND: no detectable. **End-of-Run-Effect:** ¹Tubos. **Protein Effect:** ¹Experimento, ²Factor, ³Concentración aparente, ⁴Observado (O), ⁵Esperado (E), ⁶%O/E. **Method Comparison:** Aldosterone: Aldosterona, Current: Actual (nuevo), Previous: previo.

Français. Exemple Série: ¹Tube, ²Duplicate CPM, ³CPM moyen, CPM corrigé, ⁵Pourcentage lié, ⁶Approx. Aldostérone, pg/ml, ⁷Paramètres Contrôle de Qualité, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹20% Intercept. **Intraassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Interassay Precision:** ¹Moyenne, ²SD, ³CV. **Linearity:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A, ⁵16 dans 16. **Recovery:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A. **Specificity:** ¹Composé, ²Réaction croisée%, ³ND: non détectable. **End-of-Run-Effect:** ¹Tubes. **Protein Effect:** ¹Expérience, ²Reconstitution, ³Concentration apparente, ⁴Observé (O), ⁵Attendu (A), ⁶%O/A. **Method Comparison:** Aldosterone: Aldostérone, Current: Courant (nouveau), Previous: précédent.

Italiano. Seduta Esemplificativa: ¹Provetta, ²CPM in duplicato, ³CPM Medio, ⁴CPM Netti, ⁵Percentuale di Legato, ⁶Appross. Aldosterone, pg/mL, ⁷Parametri per il Controllo di Qualità, ⁸Totale, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹Intercepta al 20%. **Precisione Intra-Dosaggio:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Precisione Inter-Dosaggio:** ¹Media, ²SD (Deviazione Standard), ³CV (Coefficiente di Variazione). **Linearità:** ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A, ⁵16 in 16. **Recupero:** ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A. **Specificità:** ¹Composto, ²Percentuale di Crossreattività, ³ND: non determinabile. **Effetto Fine Seduta:** ¹Provette. **Effetto delle Proteine:** ¹Esperimento, ²Fattore, ³Concentrazione apparente, ⁴Osservato (O), ⁵Atteso (A), ⁶%O/A. **Comparazione di Metodi:** Aldosterone: Aldosterone, Current: Attuale (nuovo), Previous: precedente.

Português Example Run: ¹Tubo, ²Duplicado CPM, ³Média de CPM, ⁴Net CPM, ⁵Percentagem de Ligação, ⁶Aprox. Aldosterona pg/mL, ⁷Parâmetros do controlo de qualidade, ⁸Total, ⁹%NSB, ¹⁰%MB, ¹¹20% Intercepção. **Intraassay Precision:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Interassay Precision:** ¹Média, ²Desvio padrão, ³Coefficiente de variação. **Linearity:** ¹Diluição, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵16 em 16. **Recovery:** ¹Solução, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Specificity:** ¹Composto, ²Percentagem de reacção cruzada, ³ND: não detectável. **End-of-Run-Effect:** ¹Tubos. **Protein Effect:**

¹Experiência, ²Factor, ³Apparent Concentration, ⁴Observado (O), ⁵Esperado (E), ⁶%O/E. **Method Comparison:** Aldosterone: Aldosterona, Current: Actual (novo), Previous: anterior.

Deutsch

Coat-A-Count Aldosteron

Anwendung: Festphasen Radioimmunoassay (beschichtete Röhrchen) zur direkten quantitativen Bestimmung von Aldosteron im unextrahiertem Serum. In Verbindung mit einer Ethylacetat Extraktion ist die Bestimmung auch im Urin möglich. Der Test ist ausschließlich in der In-Vitro-Diagnostik im Zusammenhang mit der Diagnose einzusetzen.

Artikelnummern: **TKAL1** (100 Tests), **TKAL2** (200 Tests)



Die Packung mit 100 Röhrchen enthält weniger als 3,5 Microcurie (130 Kilobecquerel) an radioaktivem ¹²⁵I-markiertem Aldosteron; die Packung mit 200 Röhrchen enthält weniger als 7 Microcurie (259 Kilobecquerel).

Klinische Relevanz

Normale Aldosteron Plasma- und Serumspiegel sind von der Natriumaufnahme und davon abhängig, ob der Patient steht oder liegt. Eine hohe Natriumaufnahme supprimiert das Aldosteron im Serum während eine niedrige Natriumaufnahme das Aldosteron im Serum erhöht.

Methodik

Im Coat-A-Count RIA der DPC (Diagnostic Products Corporation) zur Bestimmung von Aldosteron konkurriert ¹²⁵I-markiertes Aldosteron eine vorgegebene Zeit mit dem Aldosteron im Patientenserum um die Bindung an Aldosteron spezifische Antikörper, die auf die Innenwandung von Polypropylen-Röhrchen fest aufgebracht sind. Nach der Reaktion wird das freie, nicht an die Antikörper gebundene Aldosteron dekantiert oder abgesaugt und in einem Gamma Counter gemessen. Die Menge von Aldosteron in einer

Patientenprobe wird an einer Standardkurve ermittelt.

Zu pipettierende Reagenzien: 1

Testdauer: 18 Stunden bei Raumtemperatur (15–28°C).

Totalaktivität zum Zeitpunkt der Markierung: ca. 40 000 cpm

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Die Packung mit den Reagenzien sollte bei 2–8°C in einem Kühlschrank gelagert werden, der für radioaktives Material ausgewiesen ist. Die Entsorgung muss nach den jeweils gültigen Gesetzen erfolgen.

Die Reagenzien dürfen nur bis zum Verfallsdatum verwendet werden.

Einige Komponenten des Kits können Material humanen Ursprungs und/oder in anderer Weise gefährliche Inhaltsstoffe enthalten, die es unbedingt notwendig machen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten.

Die generell geltenden Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten und alle Komponenten als potenziell infektiös zu behandeln. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wurden auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper untersucht und negativ befundet.

Bestimmten Komponenten wurde Natriumazid (<0,1 g/dl) hinzugefügt. Um die Bildung von explosiven Metallaziden in Blei- und Kupferrohren zu vermeiden, sollten die Reagenzien nur zusammen mit großen Wassermengen in die Kanalisation gespült werden.

Wasser: Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser benutzen.

Radioaktivität

Der Umgang mit radioaktivem Material ist in Deutschland genehmigungspflichtig. Deshalb muss der DPC eine Kopie der aktuellen gültigen Umgangsgenehmigung des Kunden vorliegen, bevor radioaktive Reagenzien versendet werden dürfen. Die

Strahlenschutzverordnung ist zu beachten.

Das radioaktive Material ist gemäß der jeweiligen Umgangsgenehmigung zu handhaben.

Die Strahlenexposition ist zu minimieren. Spritzer sind sofort aufzuwischen und die betroffene Oberfläche zu dekontaminieren. Aerosolbildung ist zu vermeiden. Flüssiger und fester radioaktiver Abfall sind unter Beachtung der gültigen Richtlinien zu entsorgen.

Bestandteile der Testpackung: Vorbereitung

Aldosteron Antikörper beschichtete Röhrchen (TAL1)

Polypropylen-Röhrchen beschichtet mit Antikörpern gegen das Aldosteron, verpackt in wieder-verschließbaren Plastikbeuteln. Kühl lagern, vor Feuchtigkeit schützen und nach dem Öffnen wieder sorgfältig verschließen. Bei 2–8°C 1 Jahr nach dem Herstellungsdatum haltbar. Farbe: hellbraun.

TKAL1: 100 Röhrchen.

TKAL2: 200 Röhrchen.

¹²⁵I Aldosteron (TAL2)

Lyophilisiertes jodiertes Aldosteron. Jede Flasche mit **110 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser auflösen. Für 10 Minuten stehen lassen, dann durch vorsichtiges Umdrehen durchmischen. Bei 2–8°C 30 Tage nach dem Auflösen oder bis zum Verfallsdatum haltbar.

TKAL1: 1 Flasche. **TKAL2:** 2 Flasche.

Aldosteron Standards (ALC3–9)

7 Flaschen, A–G, mit Aldosteron in lyophilisiertem aufbereitetem Humanserum. Den 0-Standard A 30 Minuten vor Gebrauch mit **6,0 ml** und die Standards B–G mit je **3,0 ml** destilliertem oder deionisiertem Wasser auflösen. Volumetrische Pipetten verwenden und durch vorsichtiges Umdrehen mischen. Gekühlt lagern: Bei –20°C 30 Tage nach dem Auflösen haltbar. Für die maximale Haltbarkeit, portionieren und einfrieren.

TKAL1: 1 Set. **TKAL2:** 1 Set.

Die aufgelösten Standards enthalten 0, 25, 50, 100, 200, 600 und 1 200 pg/ml

Aldosteron in behandeltem Humanserum; ca.: 0, 69, 139, 278, 555, 1 665 und 3 300 pmol/l.

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

Gammacounter – kompatibel mit 12x75 mm Röhrchen

Wirbelmischer

Reagenzienvorbereitung

Destilliertes oder deionisiertes Wasser

Messzylinder: 110 ml

Volumetrische Pipetten: 3,0 ml und 6,0 ml

Urin Extraktion

Siehe Probenvorbereitung: Urin

Radioimmunoassay

Unbeschichtete 12x75 mm Polypropylen-Röhrchen – für T und **NSB** Röhrchen, erhältlich bei DPC

Mikropipetten: 200 µl und 1,0 ml.

Dekantierständer – erhältlich bei DPC.

Logit-Log-Papier – erhältlich bei DPC (Artikelnummer: ZP797)

DPC Immunoassay-Kontrolle (> 25 Parameter, 3 Konzentrationen) (Artikelnummer: CON6).

Probengewinnung

Serum:

Es ist keine besondere Vorbereitung der Patienten nötig. Blutentnahme durch Venenpunktion⁶ in unbeschichtete oder Heparin-Röhrchen, Trennung des Serums von den Blutzellen durch Zentrifugation, Abnahmezeitpunkt notieren.

Ergebnisse von Heparin-Plasma sind vergleichbar mit Serum, aber EDTA-Plasma führt zu Ergebnissen, welche durchschnittlich ca. 15% höher sind.

Der Einsatz einer Ultrazentrifuge wird zur Klärung von lipämischen Proben empfohlen.

Bei hämolysierten Proben besteht die Möglichkeit einer unsachgemäßen Handhabung vor Eintreffen im Labor, daher sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren.

Blutentnahmeröhrchen von verschiedenen Herstellern können differierende Werte

verursachen. Dies hängt von den verwendeten Materialien und Additiven (Gel oder physische Trennbarrieren, Gerinnungsaktivatoren und /oder Antikoagulantien) ab. Coat-A-Count Aldosteron sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden. Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

Erforderliche Menge: 200 µl pro Röhrchen.

Lagerung: 2–8°C für 7 Tage, oder 2 Monate gekühlt bei –20°C.

Die Proben vor Testbeginn auf Raumtemperatur (15–28°C) bringen und vorsichtig durchmischen. Um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu vermeiden bei Bedarf portionieren. Gefrorene Proben dürfen *nicht* durch Erhitzen im Wasserbad aufgetaut werden.

Urin:

Urin über 24 Stunden sammeln, während der Sammelperiode gekühlt lagern. Das Gesamtvolumen protokollieren und eine gut durchmischte Portion für die Analyse entnehmen. Vor der Messung sollte die Probe durch Zentrifugation oder Filtration geklärt werden. Wird die Bestimmung nicht sofort durchgeführt, sollte dem Urin Borsäure zugegeben werden (1g Borsäure pro 100 ml Urin), Urin gut mischen.

Erforderliche Menge: 0,25 ml Urin (Für das Extraktionsverfahren).

Lagerung: 7 Tage bei 2–8°C oder 1 Monat gekühlt bei –20°C.

Probenvorbereitung: Urin

Vorsichtsmaßnahmen: Ethylacetat ist ein flüchtiges entzündliches organisches Lösungsmittel. Das Eintrocknen der Probe sollte deshalb unter einem Abzug mit explosionsgeschütztem Ventilationssystem durchgeführt werden. Offenes Feuer vermeiden, nicht mit dem Mund pipettieren. Das Ethylacetat muss mindestens vom Reinheitsgrad „für die Spektroskopie“ sein.

- 1 Für jede Urinprobe je ein Glas- oder Polypropylen-Röhrchen (unbeschichtet) beschriften.

Die Röhrchen sollten fest sitzende Stopfen haben und in der Zentrifuge mit 1 500 xg belastbar sein.

- 2 Jeweils **250 µl** Urin in die vorbereiteten Röhrchen pipettieren.
Falls die Probe ausflockt oder sich ein Niederschlag gebildet hat, sollte der Urin vorher zentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung herangezogen werden.
- 3 Zur **Hydrolyse 25 µl** 3,2 nHCl in jedes Röhrchen pipettieren. Die Röhrchen gut verschließen und bei Raumtemperatur 24 Stunden im Dunkeln inkubieren.
3,2 nHCl erhält man durch Zugabe von 1,0 ml konzentrierter HCl (12n) zu 2,75 ml destilliertem Wasser (nicht umgekehrt!).
- 4 Zur **Extraktion 2,5 ml** Ethylacetat in jedes Röhrchen pipettieren und die Röhrchen wieder gut verschließen.
- 5 Alle Röhrchen **60 Minuten** mischen *leicht* umdrehen.
Überkopfmischer mit 15 – 20 Umdrehungen pro Minute mischen.
- 6 Zur guten Phasentrennung die Röhrchen 5 Minuten bei 1 500 xg zentrifugieren.
Teilweise emulgierende Proben sollten nochmals kräftig geschüttelt und zentrifugiert werden.
- 7 Bei allen Röhrchen jeweils genau **50 µl** aus der oberen (Ethylacetat) Phase auf den Boden eines unbeschichteten 12x75 mm Polypropylen-Röhrchens (aus dem Laborvorrat) pipettieren.
Geeignete Röhrchen können von DPC bezogen werden. (Keine Polystyrol oder Antikörper-beschichtete Röhrchen verwenden.) Direkt auf den Boden des Röhrchens pipettieren, Kolbenhubpipetten verwenden. Der Rest der Ethylacetat-Phase kann für spätere Verwendung durch einfaches Tiefgefrieren des Extraktionsröhrchens bei –20°C aufgehoben werden, dabei ist es nicht notwendig, die Ethylacetatphase von der wässrigen Phase zu trennen.
- 8 Unter leichter Stickstoff-Begasung bei 37°C komplett eintrocknen.

- 9 0,5 ml 0-Standard** hinzugeben. Den Extrakt durch vortexen sorgfältig resuspendieren.
- Mit der Durchführung des Radioimmunoassays wie unten beschrieben fortfahren. Wenn die Messung nicht direkt im Anschluss erfolgen kann, sollten die Extrakte gut verschlossen entweder trocken (nach Schritt 8) oder resuspendiert bei -20°C gelagert werden. Wenn gewünscht können die Volumina auch erhöht werden, wenn das in der Durchführung der Extraktion beschriebene Verhältnis nicht verändert wird.

Testansatz und Durchführung

Eine einzige Standardkurve ist die Basis zur Berechnung der Aldosteron Konzentrationen im Serum und Urin. Dementsprechend können Urin-Extrakte und Serumproben im gleichen Assay gemessen werden. Die Standards sind nach dem Auflösen gebrauchsfertig; nur Urine müssen, wie im Abschnitt „Probenvorbereitung: Urin“ beschrieben, vorher extrahiert werden. Alle Testkomponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur ($15\text{--}28^{\circ}\text{C}$) bringen.

- 1 Unbeschichtete Röhrchen:** Jeweils 2 unbeschichtete 12×75 mm Polypropylen-Röhrchen mit T (Totalaktivität) und **NSB** (unspezifische Bindung) beschriften.
- Da die unspezifische Bindung im Coat-A-Count RIA normalerweise niedrig ist hat sie keinen signifikanten Einfluss auf die Messwerte. Es kann deshalb auch auf das Mitführen der **NSB**-Röhrchen verzichtet werden.

Beschichtete Röhrchen: Jeweils 2 Aldosteron Antikörper-beschichtete Röhrchen mit A (maximale Bindung, 0-Standard) und von B bis F beschriften. Jeweils 2 weitere Antikörper-beschichtete Röhrchen für Kontrollen und Patientenproben beschriften.

Standard	pg/ml	ng/dl	pmol/l
A (MB)	0	0	0
B	25	2,5	69
C	50	5	139
D	100	10	278
E	200	20	555
F	600	60	1 665
G	1 200	120	3 300

- 2** Jeweils **200 μl** des 0-Standards A in die **NSB** und A Röhrchen und jeweils **200 μl** der restlichen Standards, Kontrollen und Patientenproben in die vorbereiteten Röhrchen pipettieren. Jeweils **200 μl** Urin Extrakt in die entsprechend beschrifteten Röhrchen pipettieren.
- Patientenproben, in denen Konzentrationen oberhalb des höchsten Standards ($1\,200\text{ pg/ml}$) erwartet werden, sind mit 0-Standard vor dem Einsatz in den Test zu verdünnen.
- Es ist gute Laborpraxis Pipetten mit Einmalspitzen zu verwenden und die Spitze von Probe zu Probe zu wechseln um Verschleppung zu vermeiden.
- 3** Jeweils **1,0 ml ^{125}I Aldosteron** hinzufügen. Leicht mischen.
- Mit Hilfe eines Pipettor-Dilutors können die Schritte 2 und 3 auch gleichzeitig durchgeführt werden. Dabei sollte aber darauf geachtet werden, dass es zu keiner Verschleppung von Probe zu Probe kommt. Das Verteilen des Tracers sollte nicht länger als 10 Minuten dauern. Die T-Röhrchen bis zur Messung (siehe Schritt 6) beiseite stellen; sie bedürfen keiner weiteren Behandlung.
- 4** Für **18 Stunden** bei Raumtemperatur ($15\text{--}28^{\circ}\text{C}$) inkubieren.
- 5** Vollständig dekantieren.
- Vollständiges Entfernen der Flüssigkeit verbessert die Präzision deutlich. Mit Hilfe eines Dekantierständers alle Röhrchen (außer die T-Röhrchen) dekantieren oder absaugen und 2–3 Minuten umgedreht stehen lassen.

Anschließend werden die Röhrchen kräftig auf Fließpapier ausgeklopft, um alle restlichen Tröpfchen zu entfernen.

- 6 Alle Röhrchen **1 Minute** im Gamma-Counter messen.

Berechnung der Ergebnisse

Um die Konzentrationen aus der Logit-Log Darstellung der Standardkurve abzulesen werden zunächst der Mittelwert der zwei Röhrchen bereinigt um den Mittelwert der **NSB** Counts pro Minute (cpm) berechnet:

Netto Counts = (Mittelwert CPM) minus (Mittelwert **NSB** CPM)

Anschließend wird die Bindung jedes Röhrchenpaars als Prozent der Maximalbindung (MB, B₀) bestimmt. Hierzu werden die mittleren CPM des A-Standards korrigiert um die mittlere **NSB** als 100% gesetzt:

Prozentbindung = (Netto Counts / Netto **MB** Counts) × 100

(Die Berechnung kann durch Weglassen der Korrektur um die **NSB** vereinfacht werden. Für Proben innerhalb des Standardbereichs werden nahezu identische Konzentrationen berechnet, wenn B/B₀ direkt aus den CPM ermittelt wird.)

Die so ermittelten B/B₀ aller Standards außer des 0-Standards werden auf der y-Achse auf Logit-Log Papier gegen die Konzentration auf der x-Achse (logarithmisch) aufgetragen. Die Punkte werden mit bestmöglicher Annäherung durch eine gerade Linie verbunden. Die Ergebnisse der unbekannten Proben können dann durch Interpolation an der Kurve abgelesen werden.

Urin Proben: Die Ergebnisse in "pg/ml", die von der Kurve abgelesen werden, müssen mit 100 multipliziert werden, um die Konzentrationen in pg/ml für die ursprünglichen unextrahierten Urinproben zu erhalten. Zur Berechnung der Aldosteron-Produktion in µg/24 Stunden muss der pg/ml-Wert durch 1 000 dividiert und anschließend mit dem 24-Stunden-Volumen in Liter multipliziert werden. Der Faktor 100 ergibt sich in folgender Weise: 0,25 ml Urin wurden in 2,5 ml Ethylacetat extrahiert (1:10 Verdünnung). 0,05 ml der Ethylacetatphase werden eingedampft und in 0,5 ml Nullstandard aufgelöst (1:10

Verdünnung). 2 x 1:10 Verdünnung = 1:100 Verdünnung. (Die Zugabe der Salzsäure während des Hydrolyse-Schritts hat keinen Einfluss auf die Verdünnung.)

Datenberechnung:

Es ist gute Laborpraxis die Ergebnisse der Doppelbestimmung auf Übereinstimmung zu prüfen und eine Grafik der Standardkurve darzustellen (auch wenn die eigentliche Berechnung durch ein Computerprogramm erfolgt) um visuell zu überprüfen, ob für die Standardkurve die geeignete Transformation verwendet wurde und um eventuell abweichende Standardkurvenpunkte zu entdecken. Es wird weiterhin empfohlen, folgende Parameter der Berechnung zu protokollieren:

T = Totalaktivität (als Counts pro Minute)

%NSB = 100 × (Mittelwert NSB Counts / Total Counts)

%MB = 100 × (Netto Counts / Total Counts)

und die 20, 50 und 80 Prozent "intercepts," wobei

20% = Konzentration bei 20 Prozent Bindung, etc.

Bitte beachten Sie, dass auch andere Auswertungen z. B. nach der 4-Parameter-Logistik akzeptabel sind. Siehe: Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Auswertebeispiel: Dieses Beispiel dient nur zur Veranschaulichung und ist nicht dazu geeignet Werte aus einem anderen Testansatz damit zu ermitteln. (siehe Tabelle "Example Run").

Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen Kontrollen mit mindestens 2 Konzentrationen (niedrig und hoch) an Aldosteron routinemäßig als unbekannte Proben einzusetzen.

Patientenergebnisse dürfen nur dann freigegeben werden, wenn die laborspezifischen Akzeptanzkriterien erfüllt sind. Hierzu sind die jeweils gültigen Richtlinien zu berücksichtigen.

Es ist gute Laborpraxis die Chargennummern, sowie das Datum der ersten Öffnung bzw. Rekonstitution der verwendeten Komponenten zu protokollieren. Die wiederholte Messung

von Proben kann bei der Beurteilung der Interassay Präzision hilfreich sein. Der Einsatz von Kontrollprobenpaaren an unterschiedlichen Positionen des Testansatzes ist hilfreich, um einen eventuellen Drift zu erkennen.

Lösungsmittel Blank:

Um exakte Resultate zu erzielen, sollte das Ethylacetat mindestens den Reinheitsgrad "Für die Spektroskopie" haben. Der zum Begasen verwendete Stickstoff darf die Proben nicht mit Öl oder Feuchtigkeit kontaminieren. (Die Verwendung einer Calciumsulfat-Falle hilft, solche Kontaminationen zu vermeiden.) Es wird empfohlen mit einem „Lösungsmittel-Blank“ die Reinheit der verwendeten Reagenzien, die nicht mit dem Kit geliefert werden, routinemäßig zu überprüfen. Hierzu wird destilliertes oder steriles Wasser in der für Urinproben beschriebenen Extraktionsprozedur eingesetzt. Die in den so behandelten Proben gemessene Aldosteron Konzentration muss faktisch 0 sein und damit unterhalb der unteren Nachweisgrenze des Assays gemessen werden.

Referenzwerte

Die folgenden Aldosteron Bereiche für Serum (oder Plasma) basieren auf einer normalen Natriumaufnahme. Normale Aldosteron Plasma- und Serumspiegel sind von der Natriumaufnahme und davon abhängig, ob der Patient steht oder liegt. Eine hohe Natriumaufnahme supprimiert das Aldosteron im Serum während eine niedrige Natriumaufnahme das Aldosteron im Serum erhöht.

Stehend	4–31 ng/dl
Liegend	1–16 ng/dl

In der Literatur werden für Aldosteron im Urin folgende Werte angegeben:

Normale Diät	6–25 µg/Tag
Salzarme Diät	17–44 µg/Tag
Salzreiche Diät	0–6 µg/Tag

Zur vollständigen Beurteilung einer pathologischen Aldosteron-Physiologie müssen Serum- bzw. Plasma-Renin,

sowie die Angiotensin-Aktivität mit einbezogen werden.

Im Labor sollten diese Ergebnisse *lediglich als Richtwerte betrachtet werden*. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereiche etablieren.

Leistungsdaten

Im folgenden Abschnitt sind Daten gezeigt, die für die Leistung des Aldosteron Coat-A-Count RIA repräsentativ sind. Die Ergebnisse sind in pg/ml angegeben. Die Ergebnisse wurden im Serum ermittelt

Umrechnungsfaktor:

pg/ml $\times$ 2,775 $\rightarrow$ pmol/l

pg/ml $\div$ 10 $\rightarrow$ ng/dl

Messbereich: 25 – 1 200 pg/ml

Analytische Sensitivität: 11 pg/ml.

Intraassay-Präzision Statistische Berechnung der Ergebnisse von 6 Proben, die in 20 Röhrchenpaaren in einem Ansatz gemessen wurden. (Siehe Tabelle "Intraassay Precision".)

Interassay-Präzision Statistische Berechnung der Ergebnisse von 6 Proben, die in 20 verschiedenen Röhrchenpaaren in mehreren Ansätzen gemessen wurden. (Siehe Tabelle "Interassay Precision".)

Linearität: Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Linearität“.)

"End of Run" Effekt: Tritt bis ca. 400 Röhrchen nicht auf. (Siehe Tabelle "End-of-Run Effect").

Wiederfindung: Proben wurden 1:19 mit 3 Aldosteron Lösungen (4 576, 8 347 und 15 071 pg/ml) versetzt und gemessen. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Recovery“.)

Spezifität: Das in diesem Testbesteck verwendete Antiserum ist hochspezifisch mit sehr niedrigen Kreuzreaktivitäten zu anderen Substanzen, die in Patientenproben vorkommen können. Die Kreuzreaktivität in % wurde auf Basis der Konzentrationen bei ca. 50% Bindung ermittelt. (siehe Tabelle „Specificity“.)

Bilirubin: Bilirubin hat in Konzentrationen bis zu 200 mg/l keinen Einfluss auf die

Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Hämolyse: Erythrozytenkonzentrate haben in Konzentrationen bis zu 30 µl/ml keinen Einfluss auf die Messung, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Lipämie: Der 600 pg/ml Standard wurde mit jedem von 2 lipämischen Serumpools seriell verdünnt. Dies führt dazu, dass der Grad der Lipämie ansteigt, während die Aldosteron Konzentration (hauptsächlich durch den Standard verursacht) abfällt. Alle Verdünnungen wurden zusammen mit dem unverdünnten Serumpool gemessen. Die Ergebnisse zeigen exzellente Wiederfindung auch bei deutlicher Lipämie.

Alternativer Probentyp: Um den Einfluss von Antikoagulantien zu überprüfen, wurde 47 Freiwilligen Blut in Röhrchen ohne Zusatz, Heparinröhrchen und EDTA-Vacutainer-Röhrchen entnommen. Alle Proben wurden im Aldosteron Coat-A-Count Verfahren gemessen. Berechnung der linearen Regression:

(Heparin) = 0,96 (Serum) – 3,0 pg/ml
r = 0,978

Mittelwerte:
175 pg/ml (Heparin)
185 pg/ml (Serum)

(EDTA) = 1,04 (Serum) + 22 pg/ml
r = 0,985

Mittelwerte:
214 pg/ml (EDTA)
185 pg/ml (Serum)

Die Ergebnisse zeigen, dass Serum und Heparin-Plasma vergleichbare Ergebnisse liefern, aber EDTA-Plasma zu Ergebnissen führt, welche durchschnittlich ca. 15% höher sind.

Protein Einfluss: Um unterschiedliche Proteinkonzentrationen zu simulieren, wurden 2,0 ml Portionen eines Humanserum-Pools gefriergetrocknet und anschließend in unterschiedlichen Volumina (1,0; 1,3; 2,0; 3,0 und 4,0 ml) an Wasser aufgelöst. Jede aufgelöste Portion wurde im Aldosteron Coat-A-Count RIA gemessen. In den mit der Hälfte des Originalvolumens aufgelösten Proben liegt eine extrem hohe Proteinkonzentration von 14 g/dl vor. (Der jeweilige Faktor, um das Auflöselvolumen zu korrigieren, ist in der Tabelle aufgelistet.) Die Ergebnisse zeigen, dass selbst große Unterschiede in

der Gesamtproteinkonzentration einen relativ kleinen Einfluss auf den Aldosteron Coat-A-Count RIA haben. (Siehe Tabelle "Protein Effect".)

Methodenvergleich 1: 236 Serumproben mit Aldosteron-Konzentrationen von 27–860 pg/ml wurden gleichzeitig im Coat-A-Count Aldosteron RIA im aktuellen Verfahren (18-Stunden Inkubation bei Raumtemperatur) und im vorherigen Verfahren (3-Stunden Inkubation bei 37°C) gemessen. Berechnung der linearen Regression: (Siehe Diagramm "Method Comparison 1")

(Aktuell) = 1,0 (Vorgänger) – 8,4 pg/ml
r = 0,985

Mittelwerte:
130 pg/ml (Aktuell)
138 pg/ml (Vorgänger)

Methodenvergleich 2: In einer anderen Studie wurden 84 Urin-Proben mit Aldosteron-Konzentrationen von 26–228 pg/ml gleichzeitig im aktuellen Verfahren (18-Stunden Inkubation bei Raumtemperatur) des Coat-A-Count Aldosteron RIA und im vorherigen Verfahren (3-Stunden Inkubation bei 37°C) gemessen. (Siehe "Method Comparison 2" Diagramm). Berechnung der linearen Regression.

(Aktuell) = 1,0 (Vorgänger) + 5,9 pg/ml
r = 0,953

Mittelwerte:
85 pg/ml (Aktuell)
77 pg/ml (Vorgänger)

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

Das Qualitätssystem der Diagnostic Products Corporation ist nach ISO 13485:2003 registriert.

Español

Coat-A-Count Aldosterona

Utilidad del análisis: Coat-A-Count Aldosterona es un radioinmunoensayo ¹²⁵I de fase sólida diseñado para la determinación cuantitativa de Aldosterona en suero sin extracción. También es apropiado para usarse con muestras de orina, junto con un procedimiento de extracción con acetato etílico. El kit está

diseñado estrictamente para uso diagnóstico *in vitro* como ayuda en el diagnóstico clínico.

Referencia: **TKAL1** (100 tubos),
TKAL2 (200 tubos)



El kit de 100 tubos contiene menos de 3.5 microcuries (130 kilobecquerels) de ^{125}I

aldosterona, y el kit de 200 tubos contiene menos de 7 microcuries (259 kilobecquerels).

Resumen y Explicación del Test

Los niveles de aldosterona normales en suero o plasma dependen de la ingestión de sodio y de si el paciente está de pie o recostado. Una alta ingesta de sodio tenderá a suprimir la aldosterona del suero, mientras que una ingesta baja de sodio elevará la aldosterona presente en suero.

Principio del análisis

Coat-A-Count Aldosterona es un radioinmunoensayo de fase sólida basado en un anticuerpo específico para aldosterona inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno. La aldosterona marcada con ^{125}I compete por sitios de unión al anticuerpo durante un tiempo fijo con la aldosterona presente en la muestra del paciente. Posteriormente se decanta el tubo, para separar la parte unida al anticuerpo de la parte libre y se cuenta en el contador gama. La cantidad de aldosterona presente en la muestra del paciente se determina con una curva de calibración.

Reactivos a pipetear: 1

Tiempo total de incubación: 18 horas a temperatura ambiente (15–28°C).

Cuentas totales en la iodización: aproximadamente 40 000 cpm

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Almacenar de 2–8°C en una cámara preparada para almacenar material radioactivo. Desechar de acuerdo a la legislación en vigor.

No usar los reactivos después de su fecha de caducidad.

Algunos componentes suministrados en el kit pueden contener material de origen humano y/o otros componentes potencialmente peligrosos que necesiten ciertas precauciones.

Siga las precauciones universales y manipule todos los componentes como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Los materiales derivados de sangre humana han sido analizados y son negativos para sífilis; para anticuerpos frente al HIV 1 y 2; para el antígeno de superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

Se ha usado Azida sodica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminación, lavar con grandes cantidades de agua para evitar la constitución de residuos de azidas metálicas, potencialmente explosivas, en las cañerías de cobre y plomo.

Agua: Usar agua destilada o desionizada.

Radioactividad

Una copia de cualquier certificado de licencia de radioisótopos (específico o general) emitido a la aduana de los EEUU se registrará en los ficheros de Diagnostic Products Corporation antes de que se puedan enviar kits o componentes conteniendo material radioactivo. Estos materiales radioactivos pueden adquirirse por cualquier cliente con la licencia específica apropiada. Con una licencia general, estos materiales radioactivos pueden adquirirse solo por médicos, veterinarios en la práctica de la medicina veterinaria, laboratorios clínicos y hospitales — y estrictamente para la clínica *in vitro* o test de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa de material radioactivo o su radiación a humanos u otros animales. Su adquisición, recepción, almacenaje, uso, transferencia y desecho están regulados y se expenderá una licencia (general o específica) de la Comisión Nuclear de EEUU o de un Estado con el NRC para su consiguiente control.

Manejar los materiales radioactivos de acuerdo a los requerimientos de su licencia general o específica. Para minimizar la exposición a la radiación, el usuario debe adherirse al cuarto conjunto de guías publicadas por el National

Bureau of Standards con el nombre *Safe Handling of Radioactive Materials* (Handbook No. 92, issued March 9, 1964) y en las consiguientes publicaciones de las autoridades Federales o Estatales.

Limpiar y descontaminar rápidamente las superficies afectadas. Evitar la generación de aerosols. Eliminar los residuos sólidos radioactivos de acuerdo con los requerimientos de su licencia. Licencias generales (NRC Form 483) pueden eliminar sus residuos sólidos radioactivos como residuos no radioactivos, después de retirar las etiquetas. Licencias específicas (NRC Form 313) se deben referir al Título 10, Código de Regulaciones Federales, Parte 20. Las licencias en Estados Asociados deben referirse a las normativas de su correspondiente Estado. Licencias generales pueden eliminar sus residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido, quitando las etiquetas de los contenedores y procesándolos como residuos sólidos. Licencias específicas pueden eliminar pequeñas cantidades de residuos líquidos radioactivos contenidos en este tipo de productos como cualquier otro material líquido. Refiérase a la normativa aplicable a su laboratorio.

Materiales Suministrados: Preparación Inicial

Tubos Recubiertos de Aldosterona Ab (TAL1)

Tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos de Aldosterona y envasados en bolsas con cierre. Almacenar refrigerados y protegidos de la condensación, cerrando cuidadosamente las bolsas después de su uso. Estable a 2–8°C durante un año a partir de la fecha de fabricación. Color: marrón claro.

TKAL1: 100 tubos. **TKAL2:** 200 tubos.

¹²⁵I Aldosterona (TAL2)

Un frasco de Aldosterona yodada liofilizada. Reconstituir cada frasco con **110 mL** de agua destilada o desionizada. Deje reposar durante 10 minutos y después mezcle *suavemente* por inversión. Estable a 2–8°C durante 30 días después de reconstituir o hasta la fecha de caducidad señalada en la

etiqueta.

TKAL1: 1 vial. **TKAL2:** 2 viales.

Calibradores Aldosterona (ALC3–9)

Siete frascos, marcados de A a G, de suero humano liofilizado procesado. Al menos *30 minutos antes de usarse*, reconstituir el calibrador cero **A** con **6,0 ml** de agua destilada o desionizada, y cada uno de los calibradores restantes **B a G** con **3,0 ml** de agua destilada o desionizada. Utilice pipetas volumétricas y mezcle agitando *suavemente*. Conservar congelados: estables a –20°C durante 30 días tras la reconstitución. Para conseguir la máxima integridad, alicuotar y congelar.

TKAL1: 1 juego. **TKAL2:** 1 juego.

Los calibradores reconstituidos contienen respectivamente, 0, 25, 50, 100, 200, 600 y 1 200 picogramos de Aldosterona por mililitro (pg/ml) en suero humano procesado; que equivalen a: 0,69, 139, 278, 555, 1 665 y 3 300 picomoles por litro (pmol/l).

Materiales Requeridos Pero No suministrados

Contador gama – compatible con tubos estándar de 12 x 75 mm

Mezclador vortex

Preparación de Reactivo

Agua destilada o desionizada

Cilindro graduado: 110 ml

Pipetas volumétricas: 3,0 ml y 6,0 ml

Extracción de Orina

Ver Preparación de la Muestra: Orina, abajo.

Radioinmunoensayo

Tubos de polipropileno limpios de 12 x 75 mm – para usar como tubos **NSB**, disponibles en DPC.

Micropipetas: 200 µl y 1,0 ml.

Gradilla de espuma - disponible en DPC

Papel para gráficas Logit-Log — available from DPC (Referencia: ZP797)

Control de tres niveles con base de suero que contiene aldosterona junto con otros más de 25 analitos. Disponible an DPC (Referencia: CON6).

Recogida de la muestra

Suero:

El paciente no necesita estar en ayunas así como tampoco cualquier otro tipo de preparación. Recoja la sangre por venopunción⁶ en tubos limpios o con heparina, anotando la toma de la muestra, y separe las células del suero por centrifugación.

Las muestras de plasma heparina proporcionan resultados que son comparables a los obtenidos con muestras de suero, pero las muestras de plasma EDTA proporcionan resultados que, por promedio, son alrededor de un 15% superiores.

Se recomienda el uso de una ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas.

Las muestras hemolizadas podrían indicar una mala manipulación de la muestra antes de ser recibida por el laboratorio; en este caso, los resultados deben interpretarse con precaución.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel o barreras físicas, activadores de la coagulación y/o anticoagulantes. El Aldosterona Coat-A-Count no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos. Para obtener detalles sobre los tipos de tubos que se han analizado, consulte la sección de Tipos de Muestras Alternativas.

Volumen requerido: 200 µl por tubo.

Conservación: 2–8°C durante 7 días, o 2 meses congeladas a –20°C.

Antes del ensayo, permitir que las muestras alcancen la temperatura ambiente y mezclar agitando suavemente o por inversión. Alicuotar, si es necesario, para evitar la repetición de congelación y descongelación. No intentar la descongelación de muestras congeladas calentándolas en un baño de agua.

Orina:

Obtenga la orina de 24 horas, manteniendo la muestra en refrigeración durante la recolección. Registre el volumen total. A no ser que el análisis se lleve a cabo de inmediato, aparte una

alícuota bien mezclada después de agregar 1 gramo de ácido bórico por cada 100 ml de orina.

Volumen requerido: 0,25 ml de orina (para la extracción).

Conservación: 7 días a 2–8°C o un mes congelada a –20°C.

Preparación de Muestra: Orina

Precauciones: El acetato etílico es un solvente orgánico volátil, inflamable. Lleve a cabo el paso de evaporación dentro de una campana equipada con un extractor de humos y a prueba de explosiones. Evite la presencia de llama y no pipetee con la boca. El acetato etílico debe ser de al menos grado espectrofotométrico.

- 1 Marque un tubo de vidrio o de polipropileno (no recubierto) para cada muestra de orina.

Los tubos deberán tener tapas que cierren bien y que puedan resistir centrifugación a 1500xg.
- 2 Pipetear **250 µl** de cada muestra de orina en el tubo apropiado.

Si la muestra esta turbia o si se ha formado un precipitado, primero centrifugue la orina y trabaje con el sobrenadante.
- 3 **Hidrólisis:** Agregar **25 µl** de 3,2 N HCl (no proporcionado) a cada tubo. Tápelos con firmeza e incubar durante 24 horas a temperatura ambiente *en la oscuridad*.

3,2 N HCl pueden hacerse agregando 1,0 ml de HCl concentrado (12N) a 2,75 ml de agua destilada. No añadir agua al ácido concentrado, ya que puede salpicar.
- 4 **Extracción:** Añadir **2,5 ml** de acetato etílico (no proporcionado) a cada tubo. Tape firmemente.
- 5 Mezclar por inversión *suave* durante **60 minutos**.

Usar un rotador mecánico programado a 15–20 revoluciones por minuto.
- 6 Centrifugar durante 5 minutos a alrededor de 1500 xg, para separar las dos capas.

Cualquier muestra emulsificada parcialmente deberá sacudirse

vigorosamente y centrifugarse nuevamente.

- 7 Evaporación:** Transfiera exactamente **50 µl** de la fase superior (acetato etílico) en un tubo de polipropileno limpio (no recubierto) de 12 x 75 mm.

Se puede obtener tubo apropiados en DPC. (No utilice tubos recubiertos de poliestireno o recubiertos de anticuerpo.) Pipetear directamente en el fondo del tubo utilizando una micropipeta de desplazamiento positivo. La fase restante del acetato etílico puede conservarse para usar en el futuro simplemente congelando el tubo de extracción a -20°C ; no es necesario separar la fase de acetato etílico de la fase acuosa.

- 8** Evaporar hasta secar completamente bajo un suave chorro de nitrógeno a 37°C .
- 9** Agregar **0,5 ml** del calibrador cero A. Vuelva a suspender completamente el extracto con ayuda del vortex. Continúe con el procedimiento del radioinmunoensayo como se describe abajo. Si no se ensaya inmediatamente, los extractos deberán almacenarse tapados firmemente a -20°C , bien secos (siguiendo el paso 8) o resuspendidos. El volumen puede aumentarse, si se desea, siempre y cuando las proporciones especificadas en el procedimiento de extracción no sean cambiadas.

Procedimiento del Radioinmunoanálisis

Una sola curva de calibración proporciona la base para determinar las concentraciones de Aldosterona en suero y en orina. Por tanto, las muestras de extractos urinarios, así como las de suero no extraído pueden procesarse en el mismo ensayo. Los calibradores, una vez reconstituidos, están listos para su uso; únicamente las muestras de orina deben someterse a una extracción previa, como se describe en la Preparación de la Muestras: Sección de Orina. Todos los componentes deben estar a temperatura ambiente ($15-28^{\circ}\text{C}$) antes de usarse.

- 1 Tubos Limpios:** Marque 4 tubos limpios (no recubiertos) de polipropileno de 12 x 75 mm como tubos T (conteos totales) y **NSB** (unión no específica) por duplicado.

Al ser característicamente bajas las uniones no específicas en el ensayo Coat-A-Count, los tubos **NSB** pueden ser omitidos sin comprometer la precisión y calidad del ensayo.

Tubos Recubiertos: Marque catorce tubos recubiertos con Aldosterona Ab con A (unión máxima) y de B a G por duplicado. Marque tubos recubiertos de anticuerpo adicionales, también por duplicado, para controles y muestras de pacientes.

Calibrador	pg/ml	ng/dl	pmol/l
A (MB)	0	0	0
B	25	2,5	69
C	50	5	139
D	100	10	278
E	200	20	555
F	600	60	1 665
G	1 200	120	3 300

- 2** Pipetear **200 µl** del calibrador cero A en los tubos **NSB** y A. Pipetear **200 µl** de cada calibrador restante, control y muestra de paciente (suero) en los tubos preparados al efecto. Pipetear **200 µl** de cada extracto urinario en los tubos marcados apropiadamente.

Las muestras que se espera contengan concentraciones de Aldosterona mayores al calibrador mas alto (1 200 pg/ml) deberán ser diluidas antes del ensayo con el calibrador cero.

Es una buena práctica el uso de micropipetas con punta desechables, cambiando las puntas entre las muestras, para evitar la contaminación por arrastre.

- 3** Agregar **1,0 ml** de ^{125}I Aldosterona a todos los tubos. Agitar en vortex breve y suavemente.

Los laboratorios equipados con un pipetor-dilutor confiable pueden manejar los pasos 2 y 3 simultáneamente, pero se deberá tener cuidado para evitar el arrastre

entre muestra y muestra. No se debe tardar más de 10 minutos durante la dispensación del trazador. Dejar los tubos T a un lado para su conteo (paso 6); no requieren más procesamiento posterior.

- 4 Incubar durante **18 horas** a temperatura ambiente (15–28°C)

- 5 Decantar.

Eliminar toda la humedad visible para mejorar la precisión. Utilizando una gradilla de hule espuma, dispense el contenido de todos los tubos (excepto los tubos T) y déjelos escurrir durante 2 o 3 minutos. Golpear los tubos contra papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

- 6 Contar durante **1 minuto** en un contador gamma.

Cálculo de resultados

Para obtener resultados en términos de concentración a partir de una representación logit-log de la curva de calibración, primero hay que calcular para cada pareja de tubos las cuentas medias por minuto corregidas con el **NSB**:

Cuentas netas = (Media CPM) menos (Media **NSB** CPM)

Entonces, determinar la unión de cada pareja de tubos como un porcentaje de la unión máxima (MB), tomando las cuentas corregidas con el **NSB** de los tubos A como 100%:

Porcentaje de Unión = (Cuentas netas / Cuentas **MB** netas) × 100

(El cálculo puede simplificarse omitiendo la corrección de las uniones no específicas; las muestras dentro del rango de calibración van a dar virtualmente el mismo resultado cuando el porcentaje de unión es calculado directamente a partir de la media de las CPM).

Usando papel gráfico logit-log, representar el porcentaje de unión en el eje vertical frente a la concentración en el eje horizontal (logarítmico) para cada calibrador no cero y dibujar la línea que pase por esos puntos aproximadamente. Los resultados de las muestras pueden ser leídos en la curva por interpolación.

Muestras de Orina: El resultado en "pg/mL" como se lee desde la curva de

calibración debe multiplicarse por 100 para obtener la concentración de Aldosterona, en picogramos por mililitro, de la muestra original de orina, no extraída. Divida este número entre 1 000 y multiplique por el volumen total *en litros*; para reportar la producción de Aldosterona en 24 horas en microgramos por día. (Se utiliza un factor de corrección de 100 porque las muestras de orina se diluyen dos veces 1 en 10; primero al extraer 0,25 ml de orina en 2,5 ml de acetato etílico y luego reconstituyendo el residuo de 0,05 ml en 0,5 ml del calibrador cero. La adición de ácido hidrocórico durante el paso de hidrólisis no tiene efecto en la dilución.)

Parámetros de Reducción de Datos:

Es una buena práctica inspeccionar los resultados para comprobar la concordancia entre los replicados, y realizar una gráfica de la curva de calibración (aunque los cálculos se realicen por ordenador) para ver la transformación más apropiada a usar y las posibles desviaciones en los puntos de calibración. También, recomendamos mantener un registro de los siguientes parámetros de la reducción de datos:

T = Cuentas totales (como cuentas por minuto)

%NSB = $100 \times (\text{Media cuentas NSB} / \text{cuentas totales})$

%MB = $100 \times (\text{Cuentas netas} / \text{Cuentas totales})$

Y los cortes 20, 50 y 80 por ciento, donde

20% = Concentración al 20 por ciento de unión, etc.

Otras aproximaciones, por ejemplo, logística 4-parámetros, también son aceptables. Ver Dudley RA, et al. "Guidelines for immunoassay data reduction". Clin Chem 1985;31:1264-71.

Ejemplo: Sólo como ilustración, no se puede utilizar para calcular resultados. (Ver tabla "Example Run").

Control de Calidad

Se deberán ensayar controles o pools de suero con al *menos* dos niveles de concentración de Aldosterona – bajo y alto – rutinariamente como desconocidos.

Informe los resultados de pacientes sólo si los resultados de control para el ensayo satisfacen el criterio establecido de aceptabilidad de su laboratorio.

Es una buena práctica de laboratorio registrar para cada ensayo los números de lote de los componentes usados, así como las fechas en las que fueron abiertos por primera vez y reconstituidos. También recomendamos el uso de gráficos diarios de los controles — como se describe, por ejemplo, en Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Las muestras repetidas pueden servir como una herramienta de valor adicional para monitorizar la precisión interensayo, y que las parejas de los tubos del control pueden espaciarse a lo largo de la tanda de ensayo para verificar la ausencia de deriva significativa.

Solvente en Blanco: Para obtener resultados de confianza, el acetato etílico debe ser cuando *menos* de grado espectrofotométrico y el origen del nitrógeno, si se emplea, no debe contaminar los tubos de evaporación con aceite o humedad. (El uso de una trampa que contenga sulfato de calcio ayudará a evitar tal contaminación.) Para comprobar la pureza de estos reactivos, que no se proporcionan con el kit, recomendamos procesar periódicamente un "solvente en blanco". Esto significa extraer y analizar agua destilada o estéril, del mismo modo que se describe para las muestras de orina, para verificar que proporciona una concentración de Aldosterona aparente esencialmente de cero, esto es, por debajo del límite de detección del ensayo.

Valores esperados

Los siguientes niveles de Aldosterona para suero (o plasma) están basados en una ingestión normal de sodio. Observe que los niveles normales de suero o plasma de Aldosterona dependen de la ingestión de sodio y de si el paciente está de pie o recostado. Una ingesta de sodio alta tenderá a suprimir la Aldosterona del suero, mientras que una ingesta baja elevará la Aldosterona del suero.

De Pie	4–31 ng/dl
Recostado	1–16 ng/dl

Se han reportado los siguientes niveles de Aldosterona urinaria.

Dieta Normal	6–25 µg/día
Sal Baja	17–44 µg/día
Sal Alto	0–6 µg/día

Una investigación completa de la patofisiología de la Aldosterona debe incluir también una valoración de la actividad plasmática de la renina /angiotensina.

Los laboratorios deben considerar estos resultados *sólo como una guía*. Cada laboratorio deberá establecer sus propios intervalos de referencia.

Características analíticas

Véase la sección "Tablas y Gráficos" para datos *representativos* del rendimiento del kit Coat-A-Count Aldosterona. Los resultados de Aldosterona en las secciones inferiores se expresan como picogramos de Aldosterona por mililitro (pg/ml). A no ser que se especifique lo contrario, los resultados fueron obtenidos a partir de muestras de suero.

Factor de Conversión:

pg/ml × 2,775 → pmol/l

pg/ml ÷ 10 → ng/dl

Intervalo de calibración: 25 – 1 200 pg/ml

Sensibilidad analítico: 11 pg/ml

Precisión intraensayo (dentro de una tanda) Las estadísticas tabuladas abajo se calcularon para cada una de once muestras a partir de los resultados de veinte pares de tubo en un solo ensayo. (Véase la tabla "Precisión Intraensayo")

Precisión entre ensayos (de una tanda a otra) Las estadísticas se calcularon para cada una de seis muestras a partir de los resultados de pares de tubos en 20 diferentes tandas de ensayo. (Véase la tabla "Precisión Interensayo".)

Linealidad: Las muestras fueron analizadas con varias diluciones. (Véase la tabla "Linealidad" para resultados representativos.)

Efecto deriva: Ninguno hasta aproximadamente 400 tubos. (Ver tabla "End-of-Run Effect").

Recuperación: Se han analizado muestras, de 1 a 19, sobrecargadas con tres soluciones de aldosterona (4 576, 8 347 y 15 071 pg/ml). (Ver la tabla

"Recuperación" para resultados representativos).

Especificidad: El anticuerpo del kit Coat-A-Count Aldosterona es muy específico para la Aldosterona, con una reactividad cruzada extremadamente baja a otros compuestos que se puedan encontrar en las muestras de pacientes. Las reactividades cruzadas que se tabulan abajo se calcularon sobre una base de peso por peso a aproximadamente 50% de unión. (Véase la tabla "Especificidad para resultados representativos.)

Bilirrubina: La presencia de bilirrubina, en concentraciones hasta 200 mg/l, no tiene ningún efecto sobre los resultados en términos de precisión.

Hemólisis: La presencia de eritrocitos hasta concentraciones de 30 μ l/ml no tiene efecto en los resultados, en lo concerniente a la precisión del ensayo.

Lipemia: El calibrador de 600 pg/ml fue diluido en serie con cada uno de dos pool de sueros lipémicos, provocando que aumentara el grado de lipemia a medida que disminuía la concentración de aldosterona (debida al calibrador primordialmente). Estas diluciones se analizaron posteriormente con el kit Coat-A-Count Aldosterona junto con los pool lipémicos sin sobrecargar. Los resultados muestran excelentes recuperación, aun en presencia de alevada lipemia.

Tipo de Muestra Alternativa: Para determinar si los anticoagulantes interfieren con el ensayo, se tomaron muestras de sangre de 47 voluntarios en tubos vacutainer limpios, con heparina y con EDTA. Todas las muestras se analizaron con el kit Coat-A-Count Aldosterona. Por regresión lineal:

(Heparina) = 0,96 (Suero) – 3,0 pg/ml
 $r = 0,978$

Medias:
175 pg/ml (Heparina)
185 pg/ml (Suero)

(EDTA) = 1,04 (Suero) + 22 pg/ml
 $r = 0,985$

Medias:
214 pg/ml (EDTA)
185 pg/ml (Suero)

Los resultados muestran que el suero y el plasma heparina proporcionan resultados comparables, mientras que el plasma EDTA proporciona resultados que en

promedio son alrededor de un 15% más altos.

Efecto Proteico: Para simular varias concentraciones de proteínas, se efectuaron experimentos en los que se liofilizaron alícuotas de 2,0 ml de un pool de suero humano y luego se reconstituyeron con varios volúmenes de agua (1,0, 1,3, 2, 3 Y 4 ml). Cada alícuota reconstituida se analizó con el kit Coat-A-Count Aldosterona. Tenga en cuenta que las alícuotas reconstituidas con la mitad del volumen original representan una concentración de proteína extremadamente alta, del orden de 14 g/dL. (Abajo aparece el factor para corregir el volumen de reconstitución.) Estos resultados indican que aun amplias variaciones en proteína total no tienen un efecto significativo con el ensayo Coat-A-Count Aldosterona.

Comparación de Métodos 1: Se analizaron simultáneamente con el kit Coat-A-Count Aldosterona 236 muestras de suero, con concentraciones de aldosterona que varían entre 27 a 860 pg/ml, con el procedimiento actual (18 horas de incubación a temperatura ambiente) y con su predecesor (3 horas de incubación a 37°C). (Ver gráfica "Metodo de Comparación 1"). Por regresión lineal:

(Actual) = 1,0 (Previo) – 8,4 pg/ml
 $r = 0,985$

Medias:
130 pg/ml (Actual)
138 pg/ml (Previo)

Comparación de Métodos 2: En otro estudio, se analizaron simultáneamente con el kit Coat-A-Count Aldosterona 84 muestras de orina, con concentraciones de Aldosterona que varían entre 26 y 228 pg/ml, con el procedimiento actual (18 horas de incubación a temperatura ambiente) y con su predecesor (3 horas de incubación a 37°C). (Ver gráfico "Metodo de Comparación 2"). Por regresión lineal.

(Actual) = 1,0 (Previo) + 5,9 pg/ml
 $r = 0,953$

Medias:
85 pg/ml (Actual)
77 pg/ml (Previo)

Asistencia técnica

Póngase en contacto con el distribuidor nacional.

El Sistema de Calidad de Diagnostic Products Corporation está registrado para la ISO 13485:2003.

Français

Coat-A-Count Aldostérone

Domaine d'utilisation: Coat-A-Count Aldostérone est un dosage radioimmunologique permettant de doser quantitativement l'aldostérone dans le sérum sans extraction et dans l'urine avec une extraction à l'acétate d'éthyle. Cette trousse est strictement destinée à l'usage diagnostic *in vitro*, comme une aide au diagnostic clinique.

Référence catalogue : **TKAL1** (100 tubes), **TKAL2** (200 tubes)



Le coffret de 100 tubes contient moins de 3,5 microcuries (130 kilobecquerels) d'aldostérone marquée à l'iode 125 ; le coffret de 200 tubes contient moins de 7 microcuries (259 kilobecquerels).

Introduction

Les taux plasmatiques ou sériques d'aldostérone dépendent du régime sodé du patient et de sa position debout ou couchée. Un régime fortement sodé tend à faire chuter l'aldostérone sérique ; au contraire, un régime pauvre en sodium élève le taux sérique d'aldostérone.

Principe du test

Le dosage Coat-A-Count Aldostérone est un dosage radioimmunologique en phase solide. Au cours de l'incubation, il y a compétition entre l'aldostérone marquée à l'iode 125 et l'aldostérone contenue dans l'échantillon plasmatique, vis-à-vis des sites de l'anticorps. L'anticorps étant fixé sur la paroi des tubes en polypropylène, il suffit d'éliminer le surnageant par décantation pour isoler facilement la fraction radioactive liée à l'anticorps. Le tube est ensuite compté sur un compteur gamma. La concentration de l'aldostérone

présente dans l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe standard.

Réactifs à distribuer: 1

Temps d'incubation totale : 18 heures à température ambiante (15–28°C).

Activité totale en début de marquage : environ 40 000 cpm

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Réactifs : Conserver à +2–8°C dans un réfrigérateur autorisé à recevoir du matériel radioactif. Éliminer les déchets conformément aux lois en vigueur.

Ne pas utiliser les réactifs au delà de leur date d'expiration.

Certains composants fournis avec ce coffret peuvent contenir des agents humains et/ou d'autres éléments potentiellement infectieux qui nécessitent certaines précautions.

Respecter les précautions d'emploi et manipuler tous les composants du coffret comme des produits potentiellement infectieux. Les réactifs dérivés de produits humains et utilisés dans ce coffret ont subi un test sérologique pour la Syphilis et des tests de dépistage pour les anticorps anti-VIH1 et 2, anti-VHC et pour l'antigène de surface de l'hépatite B, qui se sont tous avérés négatifs.

De l'azide de sodium à des concentrations inférieures à 0,1 g/dl a été ajouté comme conservateur ; lors de l'élimination, l'évacuer avec de grandes quantités d'eau pour éviter une accumulation d'azides métalliques explosifs dans les canalisations.

Eau : utiliser de l'eau distillée ou désionisée.

Radioactivité

Ce coffret de réactif est réservé à l'usage *in vitro* (Autorisation DGSNR).

Règles de base de protection contre les rayonnements ionisants et précautions d'emploi.

Ce produit radioactif ne peut être reçu, acheté, détenu ou utilisé que par des personnes autorisées à cette fin et dans des laboratoires dotés de cette autorisation. Cette solution ne peut en aucun cas être administrée à l'homme ou

aux animaux. Respecter impérativement les dates de péremption indiquées sur l'emballage extérieur et sur les étiquettes des différents réactifs du coffret. Tous les réactifs, dont les tubes revêtus d'anticorps, doivent être conservés à + 4/+ 8° C dans leur conditionnement d'origine avant d'être utilisés. L'achat, la possession, l'utilisation et l'échange de matières radioactives sont soumis aux réglementations en vigueur dans le pays de l'utilisateur. Les règles de base de protection contre les rayonnements ionisants doivent être respectées selon des procédures en vigueur. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche. Eviter le contact direct avec la peau ou les muqueuses de tout produit radioactif en utilisant des blouses et gants de protection. Toute manipulation de matières radioactives se fera dans un local ad hoc éloigné de tout passage. Les produits radioactifs seront stockés dans leur conditionnement d'origine dans un local approprié. Un cahier de réception et de stockage de produits radioactifs sera tenu à jour. Le matériel de laboratoire et la verrerie qui ont été contaminés doivent être éliminés au fur et à mesure afin d'éviter une contamination croisée de plusieurs isotopes. Chaque contamination ou perte de substance radioactive devra être réglée selon les procédures établies. Toute mise aux déchets de matière radioactive se fera en accord avec les réglementations en vigueur. Ne pas manger, ni boire, ni fumer, ni appliquer des cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Les réactifs radioactifs ne peuvent être vendus qu'à des personnes habilitées à manipuler des substances radioactives.

Matériel Fourni : Préparation Initiale

Tubes revêtus d'anticorps anti-Aldostérone (TAL1)

Tubes en polypropylène revêtus d'anticorps anti-aldostérone dans des sachets à glissière. Conserver à l'abri de l'humidité, refermer soigneusement les sachets après ouverture. Stables à +2- +8° C jusqu'à un an après fabrication. Couleur : brun clair

TKAL1: 100 tubes. **TKAL2:** 200 tubes.

Aldostérone marquée à l'iode 125 (TAL2)

Aldostérone marquée à l'iode 125, fournie sous forme lyophilisée. Reconstituer chaque flacon avec **110 ml** d'eau distillée. Laisser reposer 10 minutes, puis mélanger doucement par retournement. Conservés à + 2/+ 8° C, les flacons sont stables au moins 30 jours après reconstitution ou jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon.

TKAL1: 1 flacon. **TKAL2:** 2 flacons.

Standards Aldostérone (ALC3-9)

7 flacons marqués de A à G, standards d'aldostérone, de sérum humain lyophilisé. Reconstituer, *au moins 30 minutes* avant utilisation, le standard zéro, flacon **A**, avec **6,0 ml** d'eau distillée, et chacun des autres standards, flacons de **B à G**, avec **3,0 ml**. Utiliser des pipettes volumétriques et agiter doucement. Les conserver congelés, stable à -20°C pendant au moins 30 jours après reconstitution. Pour l'intégrité maximum, aliquoté et congelé.

TKAL1: 1 jeu. **TKAL2:** 1 jeu.

Les standards reconstitués contiennent respectivement, 0, 25, 50, 100, 200, 600 et 1 200 picogrammes par millilitre (pg/ml) d'aldostérone dans du sérum humain prétraité; équivalent à : 0, 69, 139, 278, 555, 1 665 et 3 300 pmol/l.

Matériel requis mais non fourni

Compteur Gamma – permettant l'utilisation de tubes standards 12x75 mm
Agitateur de type Vortex

Préparation des réactifs

Eau distillée ou déionisée

Eprouvette graduée: 110 ml

Pipettes volumétriques: 3,0 à 6,0 ml

Extraction des échantillons urinaires :

Voir section recueil des échantillons.

Dosage radioimmunologique

Tubes secs en polypropylène 12x75 mm – à utiliser comme tubes LNS, disponibles chez DPC

Micropipettes: 200 µl et 1,0 ml.

Un portoir de décantation – disponible chez DPC

Papier graphe Logit-log– disponible chez DPC (Référence catalogue : ZP797)

Un contrôle immunodosage, à base de sérum humain, à trois niveaux de concentration, contenant de l'aldostérone (parmi plus de 25 constituants dosables), est disponible chez DPC (Référence catalogue : CON6).

Recueil des échantillons

Sérum:

Le patient n'a pas besoin d'être à jeun et aucune préparation spéciale n'est requise. Prélever le sang par ponction veineuse et le recueillir sur tubes secs ou héparinés, en notant l'heure de prélèvement. Séparer le sérum des globules rouges par centrifugation.

Le plasma hépariné fournit des résultats équivalents au sérum mais le plasma EDTA augmente en moyenne de 15% les taux obtenus sur sérum.

Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Des échantillons hémolysés peuvent être révélateurs d'une préparation inadéquate du prélèvement avant son envoi au laboratoire ; il faudra donc interpréter les résultats avec prudence.

Des tubes pour prélèvements sanguins provenant de fabricants différents peuvent donner des résultats différents, selon les matériaux et additifs utilisés, y compris gels ou barrières physiques, activateurs de la coagulation et/ou anticoagulants. Le coffret Aldostérone Coat-A-Count n'a pas été testé sur tous les types de tubes possibles. Veuillez consulter le chapitre intitulé Autres Types d'Échantillons pour plus de renseignements sur les tubes qui ont été évalués.

Volume nécessaire : 200 µl par tube.

Conservation: 7 jours à +2–+8°C ou 2 mois à –20°C.

Avant le dosage, laisser les échantillons revenir à température ambiante (15–28°C), mélanger doucement par rotations ou retournement. Aliquoter, si nécessaire, afin d'éviter de répéter les cycles congélation / décongélation. Ne pas tenter de décongeler les spécimens congelés à l'aide d'un bain marie.

Urine :

Recueillir les urines de 24 heures sans conservateur, en gardant les échantillons au réfrigérateur après chaque recueil. Noter le volume total en ml. Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, en conserver un aliquot de 100 ml bien mélangé en ajoutant 1 g d'acide borique.

Volume Requis (protocole d'extraction): 0,25 ml d'urine.

Conservation: 7 jours à +2–8°C ou 1 mois à –20°C.

Préparation des échantillons urinaires

ATTENTION – L'acétate d'éthyle est un solvant organique inflammable et volatil : ne pas pipeter avec la bouche. Effectuer l'évaporation sous une hotte et éviter tout contact avec les flammes. L'acétate d'éthyle doit être au moins de pureté spectrophotométrique.

- 1 Etiqueter un tube de verre ou tube en polypropylène 12x75 mm (non revêtu) pour chaque échantillon urinaire.

Des tubes adaptés avec des bouchons parfaitement hermétiques sont disponibles chez DPC. Ne pas utiliser des tubes revêtus d'anticorps à ce stade.

- 2 Pipeter **250 µl** de chaque échantillon urinaire dans les tubes préparés.

Si l'échantillon est trouble, ou si un précipité s'est formé, centrifuger au préalable et utiliser le surnageant.

- 3 **Hydrolyse:** ajouter **25 µl** d'HCL 3,2 N (non fourni) dans chaque tube. Boucher soigneusement et incuber 24 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière.

(On peut obtenir de l' HCL 3,2 N en ajoutant 1 ml d'acide HCL concentré 12 N à 2,75 ml d'eau distillée, ne pas ajouter l'eau à l'acide afin d'éviter les risques de projection.)

- 4 **Extraction :** ajouter **2,5 ml** d'acétate d'éthyle (non fourni) dans chaque tube. Boucher soigneusement.

- 5 Mélanger doucement par retournement pendant **60 minutes**.

Utiliser un agitateur rotatif: 15 à 20 rotations par minute.

- 6 Centrifuger pendant **5 minutes** à environ 1500xg pour séparer les deux phases.

Tout échantillon partiellement émulsionné doit être agité vigoureusement et centrifugé à nouveau.

- 7 **Evaporation** : transférer exactement **50 µl** de la phase supérieure (acétate d'éthyle) dans un tube en polypropylène 12x75 mm (non revêtu).

Ne pas utiliser de tubes en polystyrène ou revêtus, pipeter directement vers le fond du tube à l'aide d'une micropipette à déplacement positif, le reste de la phase d'acétate d'éthyle peut être conservée pour un usage ultérieur en congelant à -20°C le tube d'extraction, il n'est pas nécessaire de séparer la phase d'acétate d'éthyle de la phase aqueuse.

- 8 Evaporer complètement à sec sous un courant d'azote modéré à 37°C.

- 9 Ajouter **0,5 ml** du standard zéro (A), agiter au vortex vigoureusement pour remettre en suspension.

Continuer le protocole de dosage radioimmunologique comme il est décrit ci-après. Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les extraits doivent être conservés soigneusement bouchés à -20°C, soit à l'état sec (étape 8) ou en suspension. Les volumes peuvent être augmentés sous condition de conserver les proportions du protocole d'extraction.

Protocole de dosage

Une courbe d'étalonnage permet de déterminer les concentrations d'aldostérone dans le sérum (ou le plasma) et dans l'urine. En conséquence, il est possible d'effectuer les dosages des extraits urinaires et des échantillons sériques (non extraits) dans la même série. Les standards, une fois reconstitués, sont prêts à l'emploi, seuls les échantillons urinaires doivent subir une extraction selon le protocole décrit dans la section précédente. Tous les composants doivent être à température ambiante avant leur utilisation (15-28°C).

- 1 **Tubes secs (non revêtus)**: Etiqueter en duplicate 4 tubes T (activité totale) et LNS, secs en polypropylène 12x75 mm.

La valeur du LNS dans la technique Coat-A-Count étant très faible, elle peut être négligée sans modifier la précision ou le contrôle de qualité.

Tubes revêtus d'anticorps: Etiqueter 14 tubes revêtus d'anticorps anti-aldostérone de A (liaison maximale) et de B à G, en duplicate. Etiqueter les tubes revêtus d'anticorps anti-aldostérone supplémentaires, également en duplicate, pour les contrôles et les échantillons patients.

Standards	pg/ml	ng/dl	pmol/l
A (Bo)	0	0	0
B	25	2,5	69
C	50	5	139
D	100	10	278
E	200	20	555
F	600	60	1 665
G	1 200	120	3 300

- 2 Pipeter **200 µl** du standard zéro dans les tubes LNS et tubes A (B0), et **200 µl** des autres standards, sérums de contrôles et échantillons de patients (sérum ou plasma) dans les tubes respectifs préparés. Pipeter **200 µl** de chaque extrait urinaire dans les tubes appropriés.

Les échantillons supposés de forte concentration doivent être dilués au préalable dans le standard zéro de la trousse avant d'effectuer le dosage.

Il est bon d'utiliser des embouts de micropipettes jetables, de changer d'embout entre les échantillons de manière à éviter toute contamination.

- 3 Ajouter **1,0 ml** du traceur aldostérone marquée à l'iode 125 à chaque tube. Mélanger rapidement et doucement à l'aide du vortex.

Les laboratoires équipés d'un appareil type pipeteur-diluteur peuvent effectuer les étapes 2 et 3 simultanément. Éviter la contamination d'un échantillon à l'autre. Le temps d'addition du traceur ne doit pas dépasser 10 minutes. Les

tubes T peuvent être mis de côté jusqu'au comptage (étape 6); ils n'ont pas d'autre traitement.

- 4 Incuber durant **18 heures** à température ambiante (15–28°C).
- 5 Décanter complètement.
Éliminer toute trace d'humidité pour améliorer la précision du dosage. À l'aide d'un portoir de décantation, décanter ou aspirer le contenu de tous les tubes (excepté les tubes T) et laisser les tubes retournés pendant 2 ou 3 minutes. Puis appliquer les fortement sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
- 6 Compter **1 minute** dans un compteur gamma.

Calcul des résultats

Afin d'obtenir des résultats en concentrations à partir d'une représentation logit-log de la courbe de calibration, calculer pour chaque doublet de tubes les coups corrigés:

CPM corrigés = (Moyenne cpm) moins (Moyenne cpm **LNS**)

Puis déterminer pour chaque doublet la capacité de liaison en pourcentage de liaison maximale (B0), corrigée des cpm dus au **LNS** des tubes A tubes considérés à 100%:

% liaison = (cpm corrigés / cpm corrigés **LM**) × 100

(Le calcul peut être simplifié en négligeant la correction due au **LNS**. Les échantillons dans la gamme d'étalonnage donnent des résultats pratiquement identiques quand la capacité de liaison est calculée directement à partir de la moyenne des CPM.)

En utilisant un papier logit-log, on porte en ordonnée les pourcentages de liaison en fonction des concentrations des calibrateurs qui ne sont pas à zéro, en abscisse. On trace une ligne droite passant approximativement par ces points. Les concentrations en aldostérone des échantillons inconnus sont déterminées par interpolation sur la courbe standard.

Echantillons urinaires:

Pour déterminer la concentration d'aldostérone d'un échantillon urinaire, il faut multiplier par 100 la valeur lue en pg/ml sur la courbe d'étalonnage. En divisant par 1000 et en multipliant par le volume total des urines en litre, on obtient la quantité d'aldostérone produite sur 24 heures. Pour déterminer la production d'aldostérone urinaire en microgrammes par jour, multiplier simplement le résultat en pg/ml par le volume urinaire en décilitre recueilli en 24 heures (µg/24 heures). Le facteur de dilution 100 est dû à la dilution de 1/10 effectuée lors de l'extraction (0,25 ml urine dans 2,5 ml d'acétate d'éthyle) puis à une autre dilution au 1/10 en reconstituant le résidu de 0,05 ml dans 0,5 ml du standard. L'addition d'HCL durant l'étape d'hydrolyse n'a pas d'effet sur la dilution.

Paramètres de exploitation des résultats:

Il est bon de vérifier les doublets et de construire une représentation graphique de la courbe de calibration (même si celle-ci est faite par ordinateur) avec les différentes valeurs de façon à visualiser le meilleur tracé et c'est une façon de détecter les points déviants. Nous recommandons aussi de suivre les paramètres suivants :

T = Activité totale (cpm)

%LNS = $100 \times (\text{Moyenne des cpm du LNS} / \text{cpm Totaux})$

%LM = $100 \times (\text{cpm corrigés} / \text{cpm totaux})$

Et les intercepts à 20, 50 et 80 % avec

20% = Concentration à 20% de liaison, etc.

Note: d'autres approches sont possibles comme l'intégration de paramètres 4-p logistique. Se rapporter à Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Exemple de série : A titre d'exemple uniquement, et non pour calculer des résultats provenant d'une autre série. (Voir le tableau « Example Run ».)

Contrôle de Qualité

Des sérums de contrôles ou des pools de sérums à au *moins* deux niveaux de concentrations – basse et élevée-

devraient être dosés en routine comme des échantillons.

Les résultats pour les patients ne devraient être transmis, seulement si les critères d'acceptabilité du laboratoire pour les résultats des contrôles ont été respectés.

Il est bon d'enregistrer pour chaque dosage les numéros de lots des composants utilisés ainsi que la date à laquelle ils ont été reconstitués ou ouverts. Nous recommandons également de noter jour après jour les résultats des contrôles – comme décrit par exemple dans Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Noter qu'un redosage d'échantillon peut être précieux pour suivre la précision inter essai, et que les doublets de tubes contrôle peuvent être espacés de façon à vérifier l'absence de dérive significative.

Blancs des solvants: Pour que les résultats soient fiables, il est nécessaire que l'acétate d'éthyle soit d'un degré de pureté spectrophotométrique suffisant et que la source d'azote utilisée pour l'évaporation soit exempte de toute contamination (graisse ou humidité). A cet effet, un piège contenant du sulfate de calcium peut être utile. Il est nécessaire d'effectuer un « blanc » pour ces réactifs non fournis avec la trousse en faisant un extrait sur l'eau distillée utilisée, de la même façon que les échantillons urinaires et de s'assurer que la valeur trouvée en aldostérone est nulle ou en dessous des limites de sensibilité du test.

Valeurs de référence

Les taux plasmatiques ou sériques d'aldostérone dépendent du régime sodé du patient et de sa position debout ou couchée lors du prélèvement. Un régime fortement sodé tend à faire chuter l'aldostérone sérique, à l'inverse, un régime pauvre en sodium élève le taux sérique d'aldostérone.

Les taux sériques suivant tiennent compte d'une alimentation sodée normale :

Debout	4–31 ng/dl
Couché	1–16 ng/dl

Les taux urinaires :

Alimentation normale	6–25 µg/jour
Régime désodé	17–44 µg/jour
Régime hypersodé	0–6 µg/jour

L'étude complète physiopathologique de l'aldostérone doit aussi comporter la mesure de l'activité rénine angiotensine.

Ces valeurs sont données à *titre indicatif uniquement*. Chaque laboratoire devra établir ses propres valeurs de référence.

Performances du test

Consulter les tableaux et graphiques pour obtenir les données *représentatives* des performances de ce test. Les résultats sont exprimés en picogrammes d'aldostérone par millilitre (pg/ml). Tous les résultats ont été obtenus à partir d'échantillons sériques.

Facteurs de conversion:

pg/ml × 2,775 → pmol/l

pg/ml ÷ 10 → ng/dl

Intervalle de linéarité : 25 – 1 200 pg/ml

Sensibilité analytique : 11 pg/ml.

Précision intra-dosage (au sein d'une même série) Les résultats ont été calculés sur six échantillons à partir des résultats de 20 tubes en duplicate dans la même série. (Voir le tableau "Intraassay Precision").

Précision inter-dosage (entre plusieurs séries) Les résultats ont été calculés sur six échantillons à partir des résultats en duplicate de 20 séries différentes. (Voir le tableau "Interassay Precision".)

Test de dilution : Des échantillons ont été dosés à différentes concentrations. (Voir le tableau « Linearity » pour des données représentatives.)

Effet de la position des tubes : Aucun jusqu'à 400 tubes. (Voir le tableau « End-of-Run Effect ».)

Test de récupération : Des échantillons chargés dans un rapport de 1 à 19 avec 3 solutions d'aldostérone (4 576, 8 347 et 15 071 pg/ml) ont été dosés. (Voir le tableau "Recovery" pour des données représentatives.)

Spécificité : L'antisérum utilisé est très spécifique de l'aldostérone. Il présente de très faibles réactivités croisées avec divers autres composés pouvant se trouver dans les échantillons des patients. Les réactions croisées indiquées ont été calculées sur la base masse pour masse à environ 50% de liaison. (Voir le tableau « Specificity ».)

Bilirubine : La présence de bilirubine ne présente aucun effet sur les résultats ni sur la précision du dosage si la concentration ne dépasse pas 200 mg/l.

Hémolyse : La présence d'agrégat d'hématies jusqu'à une concentration de 30 µl/ml, n'a aucun effet sur les résultats quant à la précision du dosage.

Lipémie : Le standard 600 pg/ml a été dilué en série avec deux pools de sérums lipémiques. Ce qui engendre un degré de lipémie augmentant alors que la concentration de l'aldostérone (due préliminairement au standard) diminue. Toutes les dilutions ont toujours été testées avec les pools lipémiques non surchargés. Les résultats montrent une bonne récupération même en présence de lipémie sévère.

Autres types d'échantillon : Afin de déterminer l'éventuelle interférence des anticoagulants sur le dosage, du sang de 47 volontaires sains a été recueilli sur tubes vacutainers secs, héparinés et EDTA. Tous les échantillons ont été dosés avec le protocole Coat-A-Count Aldostérone. Les résultats traités après régression linéaire, figurent ci-dessous :

(Héparine) = $0,96 (\text{Sérum}) - 3,0 \text{ pg/ml}$
 $r = 0,978$

Moyennes :
175 pg/ml (Héparine)
185 pg/ml (Sérum)

(EDTA) = $1,04 (\text{Sérum}) + 22 \text{ pg/ml}$
 $r = 0,985$

Moyennes :
214 pg/ml (EDTA)
185 pg/ml (Sérum)

Ces chiffres démontrent que le sérum et le plasma hépariné donneront les mêmes résultats, alors que des plasmas EDTA donneront des concentrations d'environ 15% plus hautes.

Effet des protéines: Pour simuler différentes concentrations en protéines, des expériences ont été effectuées en

reconstituant des aliquots de 2 ml de sérums humains lyophilisés avec différents volumes d'eau (1, 2, 3 et 4 ml). Chaque aliquot reconstitué a été dosé à l'aide de la méthode Coat-A-Count Aldostérone. La reconstitution des aliquotes, avec seulement la moitié du volume original, a conduit à une concentration protéique extrêmement haute, de l'ordre de 14 g/dl. Les résultats montrent, que même de grandes variations de la concentration en protéines n'ont pas d'effet sur le dosage. (Voir le tableau "Protein Effect" pour les données représentatives.)

Comparaison de méthode 1:

236 échantillons sériques, avec des concentrations d'aldostérone de 27 à 860 pg/ml, ont été analysés simultanément avec le coffret Coat-A-Count Aldostérone avec une incubation de 18 heures à température ambiante (procédure actuelle) et avec une incubation de 3 heures à 37°C (ancien protocole), la comparaison des résultats en régression linéaire donne : (voir le graphique "Method Comparison 1")

(Actuel) = $1,0 (\text{Ancien}) - 8,4 \text{ pg/ml}$
 $r = 0,985$

Moyennes :
130 pg/ml (Actuel)
138 pg/ml (Ancien)

Comparaison de méthode 2:

Dans une autre étude, 84 échantillons urinaires avec des concentrations d'aldostérone de 26 à 228 pg/ml ont été analysés simultanément avec la technique Coat-A-Count Aldostérone selon ces deux protocoles, les résultats donnent en régression linéaire, les corrélations : (voir le graphique "Method Comparison 2")

(Actuel) = $1,0 (\text{Ancien}) + 5,9 \text{ pg/ml}$
 $r = 0,953$

Moyennes :
85 pg/ml (Actuel)
77 pg/ml (Ancien)

Assistance technique

Contactez votre distributeur national. En France distribué par DPC France 90 bd National 92257 La Garenne-Colombes.

Le système d'assurance qualité de DPC est certifié ISO 13485 (2003).

Coat-A-Count Aldosterone

Uso: Il dosaggio Coat-A-Count Aldosterone è un dosaggio radioimmunologico in fase solida marcato con I^{125} per la misurazione quantitativa dei livelli di aldosterone nel siero non estratto. In associazione con un'estrazione in etil acetato, può essere utilizzato anche per dosare campioni di urina. E' a solo uso diagnostico *in vitro* quale ausilio nella diagnosi clinica.

Codice: **TKAL1** (100 provette),
TKAL2 (200 provette)



Il kit da 100 determinazioni contiene meno di 3,5 microcurie (130 kilobecquerel) di aldosterone marcato con I^{125} ; il kit da 200 determinazioni contiene meno di 7 microcurie (259 kilobecquerel),

Riassunto e spiegazione del Test

Livelli normali di aldosterone nel siero o nel plasma sono dipendenti dall'assunzione di sodio e se il paziente si trovi in posizione eretta o prona. L'assunzione di sodio in elevate quantità tende a sopprimere i livelli di aldosterone nel siero, mentre basse quantitativi provocano un innalzamento nei livelli di aldosterone.

Procedura del Dosaggio

La procedura del dosaggio Coat-A-Count Aldosterone è costituita da un radioimmunosaggio in fase solida, basato su un anticorpo specifico per l'aldosterone adeso alle pareti di una provetta di polipropilene. L'aldosterone marcato con I^{125} compete per i siti anticorpali in un tempo prefissato con l'aldosterone presente nel campione del paziente. La provetta viene quindi decantata per separare il materiale legato da quello libero e contata in un gamma counter. La quantità di aldosterone presente nel campione del paziente viene determinata dalla curva di calibrazione.

Reagenti da Dispensare: 1

Tempo Totale di Incubazione: 18 ore a temperatura ambiente (15–28°C).

Conte Totali alla iodinazione:
circa 40 000 cpm

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare a 2–8°C in un frigorifero appositamente destinato al materiale radioattivo. Eliminare secondo le normative di legge vigenti.

Non utilizzare reagenti oltre la data di scadenza.

Alcuni componenti forniti in questo kit possono contenere materiale di origine umana e/o altri ingredienti potenzialmente pericolosi che necessitano di precauzioni di utilizzo.

Seguire le precauzioni universali, e manipolare tutti i componenti come se potessero trasmettere agenti infettivi. Sono stati analizzati i materiali di origine umana e sono stati trovati non reattivi per la sifilide; per gli anticorpi anti-HIV 1 e 2; per l'Antigene di Superficie dell'Epatite B; e per gli Anticorpi anti-Epatite C.

E' stata aggiunta Sodio Azide a concentrazioni inferiori a 0,1 g/dL come conservante. Al momento dell'eliminazione, irrorare con molta acqua per evitare la formazione di azidi metalliche potenzialmente esplosive nelle tubature di piombo e di rame.

Acqua: Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata.

Radioattività

Una copia di tutti i certificati di Autorizzazione per radioisotopi (Specifico o Generico) rilasciata ad un cliente americano deve essere conservata in file presso la Diagnostic Products Corporation prima che i kit o i componenti contenenti materiale radioattivo possano essere spediti. Questi materiali radioattivi possono essere acquisiti da qualsivoglia cliente in possesso dell'Autorizzazione Specifica. Con l'Autorizzazione Generica questi materiali radioattivi possono essere acquistati solo da medici, veterinari che esercitino la professione, laboratori clinici ed ospedalieri – e solo per l'esecuzione di test clinici o di laboratorio *in vitro* che non implicino somministrazione interna o esterna del materiale radioattivo o delle

sue radiazioni alle persone o animali. La sua acquisizione, ricevimento, conservazione, utilizzo, trasferimento ed eliminazione sono soggette a regolamentazioni e ad Autorizzazione (Generica o Specifica) della Commissione Statunitense per il Nucleare o dello Stato con il quale l'NRC abbia stipulato un accordo per l'esercizio del controllo regolatorio.

Manipolare i materiali radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione Generica o Specifica. Per minimizzare l'esposizione alle radiazioni, l'utilizzatore deve attenersi alle linee guida stabilite dal National Bureau of Standards publication su "Safe Handling of Radioactive Materials" "Norme per una corretta manipolazione dei Materiali Radioattivi". (Guida N° 92, pubblicata il 9 Marzo 1964) e successive edizioni pubblicate dallo Stato e dalle Autorità Federali.

Assorbire immediatamente le fuoriuscite e decontaminare le superfici contaminate. Evitare la formazione di aerosol. Eliminare i rifiuti solidi radioattivi secondo quanto previsto dall'Autorizzazione. Le licenze generiche (possessori di NRC Form 483) possono eliminare i rifiuti radioattivi solidi come non radioattivi, dopo aver rimosso l'etichetta. I detentori di autorizzazioni specifiche (NRC Form 313) devono fare riferimento al Titolo 10, Codice delle Regolamentazioni Federali Parte 20. I detentori di Autorizzazioni negli Stati che hanno stipulato un accordo con l'NRC dovrebbero far riferimento alle regolamentazioni idonee dei loro stati. I detentori di Autorizzazioni Generali possono eliminare i rifiuti radioattivi liquidi del tipo contenuto in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. I detentori di autorizzazione devono eliminare o rendere illeggibili le etichette dei contenitori vuoti di materiali radioattivi prima di eliminare i rifiuti solidi. I detentori di autorizzazioni specifiche possono eliminare piccoli quantitativi di rifiuti radioattivi liquidi del tipo utilizzato in questo prodotto attraverso il lavello del laboratorio. Fare riferimento alle regolamentazioni appropriate applicabili al Vostro laboratorio.

Materiali Forniti: Preparazione Iniziale

Provette Coattate con Anticorpo anti-Aldosterone (TAL1)

Provette di polipropilene coattate con anticorpi anti aldosterone e confezionate in buste a cerniera. Conservare refrigerate al riparo dall'umidità, richiudendole dopo l'utilizzo. Stabili a 2–8°C per un anno dalla data di produzione.

Colore: marrone chiaro.

TKAL1: 100 provette.

TKAL2: 200 provette.

Aldosterone marcato con I¹²⁵ (TAL2)

Aldosterone iodinato liofilo. Ricostituire ogni flacone aggiungendo **110 mL** di acqua distillata o deionizzata. Lasciar riposare per 10 minuti, quindi mescolare capovolgendo la provetta. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo ricostituzione o fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

TKAL1: 1 flacone. **TKAL2:** 2 flaconi.

Calibratori Aldosterone (ALC3–9)

Sette provette, etichettate dalla A alla G, di siero umano processato liofilo. *Almeno 30 minuti prima dell'utilizzo*, ricostituire il calibratore zero **A con 6,0 mL** di acqua distillata o deionizzata, e ciascuno dei calibratori rimanenti dalla **B alla G con 3,0 mL** di acqua distillata o deionizzata. Utilizzare pipette volumetriche e mescolare capovolgendo la provetta. Conservare congelati: stabili a –20°C per 30 giorni dopo la ricostituzione. Per ottenere il massimo dell'integrità, aliquotare e congelare.

TKAL1: 1 set. **TKAL2:** 1 set.

I calibratori ricostituiti contengono rispettivamente 0, 25, 50, 100, 200, 600 e 1 200 picogrammi di aldosterone per millilitro (pg/mL) in siero umano processato; equivalenti a: 0, 69, 139, 278, 555, 1 665 e 3 300 picomoli/litro (pmol/L).

Materiali Richiesti Ma Non Forniti

Gamma counter — compatibile con provette standard 12x75 mm

Vortex mixer

Preparazione dei Reagenti

Acqua distillata o deionizzata

Beute graduate: 110 mL

Pipette volumetriche: 3,0 mL e 6,0 mL

Estrazione dell'urina

Vedi preparazione dei campioni: Urina, di cui di seguito.

Radioimmunosaggio

Provette semplici di polipropilene 12x75 mm — da utilizzarsi come provette NSB, disponibili presso DPC

Micropipette: 200 µL e 1,0 mL.

Foam — disponibili presso DPC.

Carta per grafici Logit-log — disponibile presso DPC (Codice: ZP797)

Un controllo a tre-livelli basato su siero umano, contenente aldosterone tra oltre 25 altri costituenti dosati, disponibile presso DPC (Codice: CON6).

Prelievo dei Campioni

Siero:

Non è necessario che il paziente sia a digiuno, non sono necessarie preparazioni particolari. Prelevare il sangue⁶ in provette semplici (senza anticoagulante) o provette eparinizzate, annotando l'ora del prelievo e separare il siero dalle cellule attraverso centrifugazione.

Il plasma eparinizzato produce risultati che sono comparabili al siero, ma il plasma EDTA produce risultati che sono mediamente del 15% più elevati.

Si consiglia l'utilizzo di un'ultracentrifuga per schiarire i campioni lipemici.

I campioni emolizzati posson indicare il trattamento non idoneo del campione prima dell'arrivo al laboratorio; per questo motivo, i risultati devono essere interpretati con prudenza.

Provette per il prelievo di sangue di produttori diversi possono dare valori differenti, a seconda dei materiali e degli additivi usati, incluso gel o barriere fisiche, attivatori di coaguli e/o anticoagulanti. L'Coat-A-Count Aldosterone non è stato verificato con tutte le possibili variazioni di tipi di provette. Consultare la sezione riguardante Campioni Alternativi per dettagli sulle provette testate.

Volume Richiesto: 200 µL per provetta.

Conservazione: A 2–8°C per 7 giorni, o 2 mesi congelato a –20°C.

Prima del dosaggio, consentire ai campioni di raggiungere temperatura ambiente e mescolare capovolgendo la provetta. Aliquotare, se necessario, per evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento. Non tentare di scongelare i campioni congelati riscaldandoli in un bagnetto termostato.

Urina:

Ottenere un campione di urina nelle 24 ore, mantenendo il campione refrigerato durante il prelievo. Annotare il volume totale. A meno che l'analisi non debba essere effettuata immediatamente, conservare un'aliquota ben mescolata dopo l'aggiunta di un 1 grammo di acido borico a 100 mL di urina.

Volume Richiesto: 0,25 mL di urina (per la procedura di estrazione).

Conservazione: 7 giorni a 2–8°C o un mese congelato a –20°C.

Preparazione dei Campioni: Urina

Precauzioni: l'acetato di Etile è un solvente volatile, organico ed infiammabile. Effettuare la procedura di evaporazione sotto cappa provvista di dispositivo per eventuale sviluppo di fiamme. Evitare le fiamme e non pipettare con la bocca. L'acetato di etile deve essere almeno a gradiente spettrofotometrico.

- 1 Etichettare una provetta di polipropilene o di vetro (non coattata) per ciascun campione di urina.
Le provette devono essere provviste di chiusura ermetica ed in grado di poter essere centrifugate a 1500xg.
- 2 Pipettare **250 µL** di ciascun campione di urina nelle provette appropriate.
Se il campione è torbido o se si verifica la formazione di precipitato, centrifugare l'urina e lavorare con il sovranatante.
- 3 **Idrolisi:** Aggiungere **25 µL** di 3,2 N HCl (non fornito) ad ogni provetta. Sigillare ed incubare per 24 ore a temperatura ambiente *al buio*.
L'HCl 3,2 N può essere ottenuto aggiungendo 1,0 mL di HCl concentrato (12N) a 2,75 mL di acqua distillata. Non aggiungere acqua

all'acido concentrato, poiché potrebbero prodursi delle fuoriuscite.

- 4 **Estrazione:** Aggiungere **2,5 mL** di acetato di etile (non fornito) ad ogni provetta. Sigillare.

- 5 Mescolare capovolgendo la provetta per **60 minuti**.

Utilizzare un rotatore meccanico settato a 15–20 rivoluzioni al minuto.

- 6 Centrifugare per **5 minuti** a circa 1500xg, per separare i due strati.

Qualsiasi campione parzialmente emulsionato deve essere mescolato energicamente e nuovamente centrifugato.

- 7 **Evaporazione:** Trasferire esattamente **50 µL** della fase superiore (acetato di etile) in una provetta semplice di polipropilene (non coattata) 12x75 mm.

Le provette idonee sono disponibili presso DPC. (Non utilizzare provette di polistirene o coattate con anticorpo). Dispensare direttamente al fondo delle provette utilizzando una micropipetta. Il rimanente della fase di acetato di etile può essere conservata per utilizzi futuri semplicemente congelando la provetta di estrazione a –20°C; non è necessario separare la fase di acetato di etile dalla fase acquosa.

- 8 Evaporare completamente sotto un flusso di nitrogeno a 37°C.

- 9 Aggiungere **0,5 mL** del calibratore zero A. Risospendere nuovamente l'estratto vortexando.

Effettuare il dosaggio come di seguito descritto. Se non dosati direttamente, gli estratti devono essere conservati ben sigillati a –20°C sia liofilici (seguire il punto 8) che risospesi. I volumi possono essere aumentati, se lo si desidera, a patto che le proporzioni specificate nella procedura di estrazione rimangano immutate.

Dosaggio Radioimmunologico

Un'unica curva di calibrazione fornisce la base per determinare le concentrazioni di aldosterone nel siero e nelle urine. Similmente, possono essere processati lo stesso giorno sia gli estratti urinari che i sieri non estratti. I calibratori, una volta

ricostituiti, sono pronti all'uso; solo i campioni di urina devono essere sottoposti ad estrazione, come descritto in Preparazione dei Campioni: sezione Urine. Tutti i componenti devono essere a temperatura ambiente (15–28°C) prima dell'utilizzo.

- 1 **Provette Semplici:** Etichettare quattro provette semplici (non coattate) di polipropilene da 12x75 mm con T(conte totali) ed **NSB** (legame non specifico) in duplicato.

Poiché il legame non specifico nel dosaggio Coat-A-Count è caratteristicamente basso, le provette **NSB** possono essere anche omesse senza compromettere l'accuratezza o il controllo di qualità.

Provette Coattate: Etichettare quattordici provette coattate con anticorpo anti-Aldosterone con A (legame massimo) e dalla B alla G in duplicato. Etichettare altre provette coattate con anticorpo anch'esse in duplicato, per i controlli ed i campioni dei pazienti.

Calibratori	pg/mL	ng/dL	pmol/L
A (MB)	0	0	0
B	25	2,5	69
C	50	5	139
D	100	10	278
E	200	20	555
F	600	60	1 665
G	1 200	120	3 300

- 2 Dispensare **200 µL** del calibratore zero A nelle provette **NSB** ed A, e **200 µL** di ciascuno dei calibratori controlli e campioni (Siero) rimanenti, nelle provette preparate. Dispensare **200 µL** di ciascun *estratto* urinario nelle provette adeguatamente etichettate.

Campioni con concentrazioni attese di aldosterone superiori al calibratore più elevato (1 200 pg/mL) dovrebbero essere diluiti con il calibratore zero prima del dosaggio.

Si consiglia di utilizzare un puntale monouso, cambiando il puntale tra un campione e l'altro, per evitare la contaminazione da carryover.

- 3 Aggiungere **1,0 mL** di Aldosterone marcato con I¹²⁵ ad ogni provetta. Vortexare brevemente e dolcemente. Laboratori provvisti di un dispensatore-diluitore affidabile possono eseguire i punti 2 e 3 simultaneamente, occorre fare attenzione per evitare il carryover da un campione all'altro. Non devono passare più di 10 minuti nella dispensazione del tracciante. Mettere da parte le provette T per la conta (al punto 6); non sono necessari ulteriori passaggi.
- 4 Incubare per **18 ore** a temperatura ambiente (15–28°C).
- 5 Decantare completamente. Rimuovere tutta l'umidità visibile aumentando così la precisione. Utilizzando un foam, decantare il contenuto di tutte le provette (ad eccezione delle provette T) e fare in modo che si asciughino per 2 o 3 minuti. Tamponarle su carta assorbente per eliminare completamente i liquidi.
- 6 Contare per **1 minuto** in un gamma counter.

Calcolo dei Risultati

Per ottenere i risultati in termini di concentrazione da una rappresentazione logit-log della curva di calibrazione, calcolare inizialmente per ogni coppia di provette le conte medie al minuto corrette con **NSB**:

Conte Nette = (Media dei CPM) Meno (Media CPM **NSB**)

Quindi determinare il legame di ogni coppia di provette come percentuale del legame massimo (MB), con le conte corrette-**NSB** delle provette A prese al 100%:

Percentuale di Legato = (Conte Nette / Conte Nette **MB**) × 100

(Il calcolo può essere semplificato omettendo la correzione per il legame non specifico; i campioni entro il range dei calibratori producono virtualmente gli stessi risultati quando la Percentuale di Legato viene calcolata direttamente dai CPM Medi).

Utilizzando un grafico logit-log, tracciare la Percentuale di Legato sull'asse verticale (probabilità) verso la Concentrazione sull'asse orizzontale (logaritmica) per ciascuno dei calibratori non zero e tracciare una linea retta approssimativamente lungo il tracciato di questi punti. I risultati per i campioni sconosciuti possono essere letti dalla retta attraverso interpolazione.

Campioni di Urina: I risultati in "pg/mL" cosiccome letti dalla curva di calibrazione devono essere moltiplicati per 100 per ottenere la concentrazione di aldosterone, in picogrammi per millilitro, del campione originario e di quello con urina non estratta. Dividere questa cifra per 1 000, quindi moltiplicare per il volume totale *in litri* per ottenere la produzione di aldosterone in microgrammi/giorno nelle 24 ore. (viene utilizzato un fattore di correzione di 100 poiché i campioni di urina vengono diluiti due volte 1:10: inizialmente estraendo 0,25 mL di urina in 2,5 mL di acetato di etile, quindi ricostituendo il residuo di 0,05 mL in 0,5 mL del calibratore zero. L'aggiunta di acido idroclorico durante idrolisi non ha nessun effetto sulla diluizione.

Parametri per il Calcolo dei Dati

Si consiglia di visionare i risultati per stabilire la correlazione entro i replicati e tracciare un grafico della curva di calibrazione (anche se i calcoli vengono effettuati dal computer) per visualizzare l'appropriatezza della trasformazione utilizzata e per individuare i punti devianti all'interno della calibrazione. Consigliamo anche di mantenere una rintracciabilità dei parametri utilizzati per la riduzione dei dati:

T = Conte Totali (conte al minuto)

%NSB = 100 × (Conte NSB Medie / Conte Totali)

%MB = 100 × (Conte Nette / Conte Totali)

E le "intercette" al 20, 50 ed 80%, dove

20% = Concentrazione al 20% di Legato ecc.

Nota: sono accettabili anche altri tipi di approccio, quali: l'implementazione della logistica a 4 parametri. Vedi Dudley Ra et al. Guidelines for immunoassay data Reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Seduta Esemplificativa: a solo scopo illustrativo e non per calcolare i risultati di

un'altra seduta. (vedi tabella "Example Run").

Controllo di Qualità

Pool di controlli o di sieri con alMeno due livelli di concentrazione di aldosterone — basso ed alto — devono essere dosati in routine come campioni sconosciuti.

Riportare i risultati dei pazienti solo se i risultati dei controlli sono conformi ai criteri di accettabilità stabiliti per il Vostro laboratorio.

Si consiglia per ogni dosaggio di annotare i numeri di lotto dei componenti utilizzati, quali le date di ricostituzione o di apertura. Si consiglia anche di tracciare i grafici dei risultati dei controlli giorno dopo giorno — come descritto, ad esempio, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Campioni ripetuti possono servire come ulteriore strumento per monitorare la precisione inter-dosaggio; coppie di campioni intervallate lungo tutto il dosaggio possono essere d'aiuto nel verificare l'assenza di deviazioni significative.

Bianchi Solventi: Per ottenere risultati affidabili, l'acetato di etile deve essere alMeno a gradiente spettrofotometrico e la sorgente di nitrogeno, se utilizzata, non deve contaminare le provette in evaporazione con olio o umidità. (L'utilizzo di una trappola contenente solfato di calcio eviterà tale contaminazione). Come verifica della purezza di questi reagenti, che non vengono forniti con il kit, consigliamo di processare periodicamente "un bianco solvente". Ciò comporta l'estrazione ed il dosaggio di acqua distillata o sterile nella maniera indicata per i campioni di urina, per verificare che produca una concentrazione apparente di aldosterone sostanzialmente zero, cioè, al di sotto del limite di rilevazione del dosaggio.

Valori Attesi

I seguenti livelli di aldosterone per il siero (o plasma) sono basati su un normale assorbimento del sodio. Notare che i livelli normali di aldosterone nel siero o nel plasma dipendono dall'assorbimento del sodio e se il paziente sia in posizione eretta o coricata. Un assorbimento elevato di sodio tenderà a sopprimere i valori di

aldosterone nel siero, mentre un assorbimento basso provocherà un innalzamento del livello di aldosterone nel siero.

Posizione eretta	4–31 ng/dL
Posizione coricata	1–16 ng/dL

Sono stati riportati i seguenti livelli urinari.

Dieta Normale	6–25 µg/giorno
Basso contenuto di sale	17–44 µg/giorno
Elevato contenuto di sale	0–6 µg/giorno

Un'indagine completa sulla patofisiologia dell'aldosterone deve anche comprendere una verifica dell'attività della renina/angiotensina plasmatica.

I laboratori devono considerare questi risultati *soltanto come linee guida*. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri range di riferimento.

Prestazioni del Dosaggio

Vedi Tabelle e Grafici per dati *representativi* delle prestazioni del dosaggio Coat-A-Count Aldosterone. I risultati dell'aldosterone nelle sezioni di cui di seguito sono espressi in pg/mL. Se non diversamente specificato, tutti i risultati sono stati generati su campioni di siero.

Fattori di Conversione:

pg/mL × 2,775 → pmol/L

pg/mL ÷ 10 → ng/dL

Range di calibrazione: 25 – 1 200 pg/mL

Sensibilità analitica: 11 pg/mL.

Precisione Intra-Dosaggio (All'interno della stessa seduta) Sono state calcolate statistiche per ciascuno dei sei campioni dai risultati di venti coppie di provette in un unico dosaggio (vedi tabella "Intraassay Precision")

Precisione Inter-Dosaggio (Da una seduta all'altra) Sono state calcolate statistiche per ciascuno dei sei campioni dai risultati di coppie di provette in 20 dosaggi diversi (vedi tabella "Interassay Precision")

Linearità: I campioni sono stati dosati a varie diluizioni. (Vedi tabella "Linearity" per dati rappresentativi.)

Effetto Fine-Seduta: Nessuno fino a circa 400 provette. (vedi tabella "End-of-Run Effect").

Recupero: Sono stati dosati campioni 1:19 cui sono state aggiunte tre soluzioni di aldosterone (4 576, 8 347 e 15 071 pg/mL) (Vedi tabella "Recovery" per dati rappresentativi).

Specificità: L'antisiero per il kit Coat-A-Count Aldosterone è altamente specifico per l'aldosterone, con una crossreattività estremamente bassa verso altri composti che possano trovarsi nei campioni dei pazienti. Le crossreattività sono state calcolare peso/peso a circa il 50% del legame. (Vedi tabella "Specificity" per dati rappresentativi.)

Bilirubina: La presenza di bilirubina in concentrazioni fino a 200 mg/L non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Emolisi: La presenza di globuli rossi impaccati in concentrazioni fino a 30 μ L/mL non ha effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Lipemia: Il calibratore da 600 pg/mL è stato diluito serialmente con ciascuno dei due pool di sieri lipemici, provocando un innalzamento del grado di lipemia nel momento in cui decresce la concentrazione di aldosterone (a causa principalmente del calibratore). Le diluizioni sono state dosate con il dosaggio Coat-A-Count Aldosterone insieme ai pool lipemici non diluiti. I risultati presentano eccellenti recuperi anche in presenza di campioni grossolanamente lipemici.

Tipo di Campione Alternativo: Per determinare se gli anticoagulanti interferiscano con il dosaggio, è stato prelevato del sangue da 47 volontari in provette semplici, eparinizzate e vacutainer EDTA. Tutti i campioni sono stati dosati con il dosaggio Coat-A-Count Aldosterone. I risultati erano soggetti a analisi con regressione lineare.

(Eparina) = 0,96 (Siero) – 3,0 pg/mL
 $r = 0,978$

Valore medio:
175 pg/mL (Eparina)
185 pg/mL (Siero)

(EDTA) = 1,04 (Siero) + 22 pg/mL
 $r = 0,985$

Valore Medio:
214 pg/mL (EDTA)
185 pg/mL (Siero)

I risultati mostrano che il siero ed il plasma eparinizzato producono risultati comparabili, mentre il plasma EDTA produce risultati che sono in media circa del 15% più elevati.

Effetto delle Proteine: Per simulare le diverse concentrazioni di proteine, sono stati effettuati esperimenti nei quali aliquote da 2,0 mL di pool di sieri umani sono state liofilizzate e quindi ricostituite con vari volumi di acqua (1,0, 1,3, 2,0, 3,0 e 4,0 mL). Ciascuna delle aliquote ricostituite è stata quindi dosata con il dosaggio Coat-A-Count Aldosterone. Notare che le aliquote ricostituite con metà del volume originario rappresentano una concentrazione estremamente elevata di proteine, nell'ordine di 14 g/dL. (Il fattore per correggere il volume di ricostituzione è di tabulato di seguito). Questi risultati indicano che anche variazioni ampie nel contenuto di proteine hanno un effetto relativamente piccolo sul dosaggio Coat-A-Count Aldosterone. (Vedi tabella "Protein Effect".)

Comparazione di Metodi 1: Sono stati dosati simultaneamente duecentotrentasei campioni di siero con concentrazioni di aldosterone da 27 a 860 pg/mL, con l'attuale dosaggio Coat-A-Count Aldosterone (incubazione di 18-ore a temperatura ambiente) ed con un dosaggio precedente (incubazione di 3-ore a 37°C). (vedi grafico "Comparazione di Metodi 1") Con regressione lineare.

(Attuale) = 1,0 (Precedente) – 8,4 pg/mL
 $r = 0,985$

Valore medio:
130 pg/mL (Attuale)
138 pg/mL (Precedente)

Comparazione di Metodi 2: In un altro studio, sono stati dosati simultaneamente 84 campioni di urina, con concentrazioni di aldosterone da 26 a 228 pg/mL con l'attuale dosaggio Coat-A-Count Aldosterone (incubazione di 18-ore a temperatura ambiente) e con un dosaggio precedente (incubazione di 3-ore a 37°C) (vedi grafico "Comparazione di Metodi 2") Con regressione lineare.

(Attuale) = 1,0 (Precedente) + 5,9 pg/mL
 $r = 0,953$

Valore medio:
85 pg/mL (Attuale)
77 pg/mL (Precedente)

Assistenza Tecnica

All'estero: contattare il proprio distributore nazionale.

Il Sistema Qualità della Diagnostic Products Corporation è certificato secondo le norme ISO 13485:2003.

Português

Coat-A-Count Aldosterone

Utilização: O Coat-A-Count Aldosterone é um radioimunoensaio ^{125}I de fase sólida concebido para a medição quantitativa dos níveis de aldosterona no soro não preparado. Junto com um procedimento de extracção com acetato etílico, adequa-se igualmente à execução de ensaios em amostras de urina. O kit destina-se estritamente ao uso de diagnóstico *in vitro* como auxiliar no diagnóstico clínico.

Números de catálogo: **TKAL1** (100 tubos), **TKAL2** (200 tubos)



O kit de 100 tubos contém *Menos* de 3,5 microcuries (130 quilibecquerels) de aldosterona radioactiva ^{125}I e o kit de 200 tubos contém *Menos* de 7 microcuries (259 quilibecquerels).

Sumário e explicação do teste

Os níveis normais de aldosterona no soro ou no plasma dependem da ingestão de sódio e de o paciente estar em pé ou deitado. Uma elevada ingestão de sódio suprime geralmente a aldosterona no soro, enquanto que uma baixa ingestão de sódio aumenta o nível de aldosterona no soro.

Princípio do Procedimento

O procedimento Coat-A-Count é um radioimunoensaio de fase sólida baseado em anticorpos específicos da aldosterona imobilizados na parede de um tubo de polipropileno. A aldosterona marcada com ^{125}I compete durante um período de tempo fixo com a aldosterona por locais de fixação de anticorpos na amostra do paciente. O tubo é então decantado, de

forma a separar a aldosterona ligada e a aldosterona livre, sendo em seguida colocado num contador gama. A quantidade de aldosterona presente na amostra do paciente é determinada a partir de uma curva de calibração.

Reagentes para Pipetar: 1

Tempo de Incubação: 18 horas à temperatura ambiente (15–28°C).

Contagens Totais na Marcação com o Iodo: aproximadamente 40 000 cpm

Precauções

Para uso de diagnóstico *in vitro*.

Reagentes: Conservar a 2–8°C num frigorífico destinado para materiais radioactivos. Eliminar de acordo com as leis aplicáveis.

Não utilize reagentes com prazo de validade expirado.

Alguns componentes fornecidos com este dispositivo podem conter matéria de origem humana e/ou outros ingredientes potencialmente perigosos que necessitem de algumas precauções.

Manipule com as devidas precauções todos os materiais capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias primas, obtidas de soro humano, foram testadas, revelando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2; para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) e para os anticorpos do vírus da hepatite C.

Azida de sódio foi adicionada como conservante; para evitar acumulações de azidas metálicas explosivas em canalizações de cobre e alumínio, os reagentes devem ser rejeitados no esgoto apenas se estiverem diluídos e forem lavados com grandes volumes de água.

Água: Utilize água destilada ou desionizada.

Radioactividade

Uma cópia da licença de uso de produtos radioactivos (específico ou geral) enviada pelo cliente, deve estar em poder da DPC antes do envio dos kits ou componentes contendo material radioactivo. Estes materiais radioactivos podem ser adquiridos por qualquer cliente que possua a necessária licença específica.

Com uma licença generalista estes produtos radioactivos só podem ser adquiridos por médicos, veterinários na prática de medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais. E somente para uso clínico *in vitro* ou testes laboratoriais não envolvendo administração externa ou interna do material radioactivo ou da sua radiação para o ser humano ou outros animais. A sua aquisição, receita, armazenamento uso, transporte e eliminação estão sujeitas aos regulamentos e à licenciada Comissão de Regulação Nuclear ou do Estado respectivo de acordo com a lei em vigor.

Tratar os materiais radioactivos de acordo com a regulamentação da sua licença, específica ou generalista. De modo a minimizar a exposição à radiação deve o utilizador seguir as instruções da publicação do Departamento Nacional de Padrões (*Utilização segura de materiais radioactivos*-Livro No. 92, publicado em Março de 1964) e publicações seguintes do Estado e Autoridades Federais.

Limpar os derrames prontamente e descontamine as superfícies afectadas. Evitar os aerossóis. Elimine os lixos radioactivos de acordo com a regulamentação da licença. As licenças generalistas (portadores da licença NRC 483) podem eliminar os lixos sólidos radioactivos como lixo não radioactivo depois de remover os rótulos. Licenças Específicas (Licença NRC 313) devem ter em conta o Capítulo 10 do artigo 20, do Código de Regulamentações Federais. Cada Estado deve referir a legislação em vigor aprovada para o seu território. As licenças generalistas podem eliminar os lixos radioactivos líquidos do tipo deste produto para um esgoto de laboratório. Os licenciados devem remover os rótulos dos frascos vazios de materiais radioactivos antes de os colocar no esgoto sólido. As licenças específicas podem eliminar pequenas quantidades de lixo radioactivo deste tipo de produto para o esgoto normal do laboratório. Ter em atenção as regulamentações em vigor para o seu laboratório.

Materiais fornecidos: Preparação inicial

Tubos Revestidos com Anticorpos de Aldosterona (TAL1)

Tubos de polipropileno revestidos com anticorpos para aldosterona e embalados em saquetas de fecho hermético. Conservar refrigerado e protegido da humidade, selar os sacos cuidadosamente após cada abertura. Estável a 2–8°C durante um ano a partir da data de fabrico. Cor: castanho claro.
TKAL1: 100 tubos. **TKAL2:** 200 tubos.

Aldosterona ¹²⁵I (TAL2)

Aldosterona liofilizada iodada. Reconstituir cada frasco, adicionando **110 mL** medidos de água destilada ou desionizada. Deixar repousar durante 10 minutos e, em seguida, misturar por inversão *suave*. Estável a uma temperatura de 2–8°C durante 30 dias após a reconstituição, ou até ao prazo de validade indicado no rótulo.
TKAL1: 1 frasco. **TKAL2:** 2 frascos.

Calibradores de Aldosterona (ALC3–9)

Sete frascos, rotulados de A a G, de soro humano processado liofilizado. *Pelo Menos 30 minutos antes da utilização*, reconstituir o calibrador zero **A com 6,0 mL** de água destilada ou desionizada, e cada um dos restantes calibradores de **B a G com 3,0 mL** de água destilada ou desionizada. Utilizar pipetas volumétricas e misturar por agitação *suave*. Armazenar no congelador: estável a uma temperatura de –20°C durante 30 dias após a reconstituição. Para garantir o máximo de integridade, aliquotar e congelar.
TKAL1: 1 conjunto. **TKAL2:** 1 conjunto.

Os calibradores reconstituídos contêm, respectivamente, 0, 25, 50, 100, 200, 600 e 1 200 picogramas de aldosterona por mililitro (pg/mL) em soro humano processado, equivalendo a: 0, 69, 139, 278, 555, 1 665 e 3 300 picomoles por litro (pmol/L).

Materiais necessários mas não fornecidos

Contador gama — compatível com tubos standard 12×75 mm
Agitador Vortex

Preparação dos Reagentes

Água destilada ou desionizada

Proveta graduada: 110 mL

Pipetas volumétricas: 3,0 mL e 6,0 mL

Preparação de Urina

Ver Preparação das Amostras: Urina, em baixo:

Radioimunoensaio

Tubos lisos de polipropileno de 12x75 mm — para utilização como tubos **NSB**, disponíveis na DPC

Micropipetas: 200 µL e 1,0 mL.

Dispositivo de decantação de espuma — disponível na DPC

Papel milimétrico logit-log — disponível na DPC (Números de catálogo: ZP797)

Um controlo de imunoensaio de três níveis e baseado em soro humano, contendo aldosterona como um de mais de 25 constituintes, está disponível na DPC (Números de catálogo: CON6).

Colheita

Soro:

O paciente não necessita dieta. Não são necessárias preparações especiais. Colher sangue por punção venosa para tubos lisos ou heparinizados, registando a hora e data da colheita, e separar o soro das células por centrifugação.

O plasma heparinizado produz resultados comparáveis aos do soro, mas o plasma de EDTA produz resultados em média 15% superiores.

Recomenda-se o uso de uma ultra centrífuga para clarear amostras lipémicas.

Amostras hemolisadas podem indicar tratamento incorrecto de uma amostra antes do envio para o laboratório; portanto os resultados devem ser interpretados com cuidado.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes. Coat-A-Count Aldosterona não foram ainda testados com todas as possíveis variações originadas pelos tipos de tubos. Consultar

a secção Tipos de Amostras Alternativas para obter detalhes sobre os tubos que foram testados.

Volume de Amostra: 200 µL por tubo.

Armazenamento: A 2–8°C durante 7 dias, ou 2 meses congelado a –20°C.

Antes de proceder ao ensaio, deixar que as amostras atinjam a temperatura ambiente e misturar por agitação ou inversão *suaves*. Aliquotar se necessário para evitar repetidos congelamentos/descongelamentos. *Não descongelar as amostras por aquecimento em banho-maria.*

Urina:

Colher uma amostra de 24 horas, mantendo o espécimen refrigerado durante a colheita. Registar o volume total. *A Menos* que se proceda imediatamente à análise, reservar uma alíquota bem homogeneizada após a adição de 1 grama de ácido bórico por 100 mL de urina.

Volume de Amostra: 0,25 mL urina (para o procedimento de preparação).

Armazenamento: 7 dias a 2–8°C ou 1 mês congelado a –20°C.

Preparação das Amostras: Urina

Precauções: O acetato etílico é um solvente orgânico volátil e inflamável. Efectuar a fase de evaporação sob um exaustor equipado com uma ventoinha de exaustão à prova de explosão. Evitar chamas expostas e não pipetar com a boca. O acetato etílico tem de apresentar pelo Menos qualidade espectrofotométrica.

- 1 Rotular um tubo de vidro ou de polipropileno (não revestido) para cada amostra de urina.

Os tubos devem apresentar tampas herméticas e ser resistentes à centrifugação a 1500xg.

- 2 Pipetar **250 µL** de cada amostra de urina para o tubo adequado.

Se a amostra estiver turva ou se se tiver formado um precipitado, começar por centrifugar a urina e trabalhar com o sobrenadante.

- 3 Hidrólise:** Adicionar **25 µL** de 3.2 N HCl (não fornecido) a todos os tubos. Tapar bem e incubar durante 24 horas à temperatura ambiente às *escuras*.

É possível obter 3.2 N HCl adicionando 1,0 mL de HCl concentrado (12N) a 2,75 mL de água destilada. Não adicionar água a ácido concentrado, uma vez que pode causar salpicos.

- 4 Preparação:** Adicionar **2,5 mL** de acetato etílico (não fornecido) a todos os tubos. Tapar bem.

- 5** Misturar por inversão suave durante **60 minutos**.

Utilizar um rotador mecânico configurado para 15–20 rotações por minuto.

- 6** Centrifugar durante **5 minutos** a cerca de 1500xg, para separar as duas camadas.

Qualquer amostra parcialmente emulsionada deve ser vigorosamente agitada e novamente centrifugada.

- 7 Evaporação:** Transferir exactamente, e de forma limpa, **50 µL** da fase superior (acetato etílico) para um tubo de polipropileno liso (não revestido) de 12x75 mm.

Tubos adequados estão disponíveis na DPC. (Não utilizar tubos de poliestireno ou revestidos com anticorpos.) Pipetar directamente para o fundo do tubo, utilizando uma micropipeta de transporte positiva. A restante fase de acetato etílico pode ser guardada para utilização posterior, congelando simplesmente o tubo de preparação a –20°C; não é necessário separar a fase de acetato etílico da fase aquosa.

- 8** Evaporar até secar completamente, sob um fluxo suave de azoto a 37°C.

- 9** Adicionar **0,5 mL** do calibrador zero A. Turbilhonar exaustivamente a preparação, recriando uma suspensão.

Passar ao procedimento de radioimunoensaio, da forma descrita em seguida. Caso o ensaio não seja efectuado imediatamente, as preparações devem ser armazenadas fechadas hermeticamente a –20°C,

secas (de acordo com o passo 8) ou sob nova suspensão. Se assim se pretender, os volumes podem ser aumentados, desde que as proporções especificadas no procedimento de preparação permaneçam inalteradas.

Técnica de Radioimunoensaio

Uma única curva de calibração constitui a base para determinar as concentrações de aldosterona no soro e na urina. Deste modo, tanto as preparações de urina como as amostras de soro não preparadas podem ser processadas no mesmo ensaio. Os calibradores, uma vez reconstituídos, estão prontos a usar; só as amostras de urina têm de ser submetidas ao procedimento de preparação, de acordo com o descrito na secção Preparação das Amostras: secção Urina. Todos os componentes devem estar à temperatura ambiente(15–28°C) antes de usar.

- 1 Tubos lisos:** Rotular em duplicado quatro tubos T (contagens totais) e **NSB** (ligação não específica) de polipropileno lisos (não revestidos) de 12x75 mm.

Devido ao facto das ligações não específicas no método de Coat-A-Count serem geralmente baixas os valores de **NSB** podem ser omitidos sem comprometer a precisão ou controle de qualidade.

Tubos revestidos: Rotular em duplicado catorze tubos revestidos com Anticorpos de Aldosterona com A (ligação máxima) e com B a G. Rotular tubos adicionais revestidos com anticorpos, também em duplicado, para controlos e amostras de paciente.

Calibradores	pg/mL	ng/dL	pmol/L
A (MB)	0	0	0
B	25	2,5	69
C	50	5	139
D	100	10	278
E	200	20	555
F	600	60	1 665
G	1 200	120	3 300

- 2** Pipetar **200 µL** do calibrador zero A para os tubos **NSB** e A, e **200 µL** de

cada um dos restantes calibrador, controlo e amostra de paciente (soro) para os tubos preparados. Pipetar **200 µL** de cada *preparação* de urina para tubos correctamente rotulados.

As amostras de paciente que se preveja que contenham concentrações de aldosterona superiores à do calibrador mais elevado (1 200 pg/mL) deverão ser diluídas com o calibrador zero antes do ensaio.

É boa prática usar uma pipeta de pontas descartáveis, mudando a ponta entre as amostras de modo a evitar contaminação.

- 3** Adicionar **1,0 mL** de aldosterona ¹²⁵I a cada tubo. Turbilhonar suave e brevemente.

Os laboratórios equipados com um pipetador-diluidor fiável podem efectuar os passos 2 e 3 em simultâneo, embora devam ter o cuidado de evitar a contaminação entre amostras. Adicionar o marcador I 125 no espaço de 10 minutos após pipetar os calibradores, controlos e amostras. Deixar os tubos T para as contagens (nº 6); não necessitam mais processamento.

- 4** Incubar durante **18 horas** à temperatura ambiente (15–28°C).

- 5** Decantar vigorosamente.

Removendo todo o líquido remanescente melhora-se bastante a precisão. Decantar o conteúdo de todos os tubos (à excepção dos tubos T) usando um dispositivo de decantação de espuma, e deixá-los drenar durante 2 ou 3 minutos. Eliminar todas as gotas residuais com papel absorvente.

- 6** Contar **1 minuto** em contador gama.

Cálculo dos Resultados

Para obter resultados de concentrações numa representação logit-log da curva de calibração, deve em primeiro lugar calcular-se para cada par de tubos a média de **NSB**-contagens por minuto corrigidas:

Contagens reais = (Média CPM) minutos (Média **NSB** CPM)

Determine a ligação de cada par de tubos como percentagem do máximo de ligação (MB), com o **NSB**-contagens por minuto corrigidas dos tubos A tidas como 100%:

Percentagem de Ligação = (Contagens reais / Contagens **MB** reais) × 100

(O cálculo pode ser simplificado omitindo a correcção para a ligação não específica; amostras dentro da gama de calibração originam virtualmente os mesmos resultados quando a Percentagem de Ligação é calculada directamente da Média de CPM.)

Usando um papel milimétrico logit-log, represente a Percentagem de Ligação no eixo vertical (probabilidade) contra a Concentração no eixo horizontal (logaritmico) para cada um dos calibradores diferentes de zero, e representar uma linha recta em função da trajectória destes pontos. Resultados de amostras desconhecidas podem então ser lidas nessa recta por interpolação.

Amostras de Urina: O resultado em "pg/mL" lido com base na curva de calibração tem de ser multiplicado por 100 para obter a concentração de aldosterona, em picogramas por mililitro, da amostra de urina original e sem preparação. Dividir este valor por 1 000 e, em seguida, multiplicar pelo volume total *em litros* para obter a produção de aldosterona de 24 horas em microgramas por dia. (É utilizado um factor de correcção de 100 porque as amostras de urina são diluídas duas vezes numa proporção 1:10: primeiro na preparação de 0,25 mL de urina em 2,5 mL de acetato etílico e, depois, na reconstituição do resíduo de 0,05 mL em 0,5 mL de calibrador zero. A adição de ácido clorídrico durante a hidrólise não tem qualquer efeito sobre a diluição.)

Parâmetros de Redução de Dados:

É boa prática verificar os resultados pela concordância entre as réplicas, e construir um gráfico da curva de calibração (mesmo que os cálculos sejam efectuados por computador) para verificação visual da aplicabilidade da transformação usada e como forma para detectar pontos de calibração que se afastem. Também se recomenda guardar estas curvas:

T = Contagens Totais (como contagens por minuto)

%NSB = $100 \times (\text{Média Contagens NSB} / \text{Contagens Totais})$

%MB = $100 \times (\text{Contagens reais} / \text{Contagens Totais})$

E os 20, 50 e 80 por cento "intercepta," onde

20% = Concentração a 20 por cento de Ligação, etc.

Note que para outras perspectivas, como a implementação de uma logística de 4 parâmetros, também é aceitável. Ver Dudley RA, et al. Guidelines for immunoassay data reduction. Clin Chem 1985;31:1264-71.

Exemplo de Ensaio: Apenas para ilustração, não para calcular resultados de outro ensaio. (Ver tabela "Example Run".)

Controlo de Qualidade

Os controlos ou os pools de soro com pelo *Menos* dois níveis de concentração de aldosterona — baixo e alto — devem ser submetidos por rotina a ensaio como amostras desconhecidas.

Comunicar resultados de paciente apenas se os resultados de controlo do ensaio cumprirem os critérios de admissibilidade estabelecidos pelo seu laboratório.

É boa prática laboratorial registar para cada ensaio o número do lote dos componentes usados, bem como as datas de quando foram primeiro reconstituídas ou abertas. Recomenda-se registar os valores diários em gráfico — como descrito, por exemplo, in Westgard JO, et al. A multi-rule chart for quality control. Clin Chem 1981;27:493-501. Note que amostras repetidas podem servir como ferramenta adicional para monitorizar a precisão inter-ensaio, e que pares de controlos podem ser colocados ao longo do ensaio para ajudar a verificar a ausência de variação significativa.

Ensaio sem Solventes: Para obter resultados fiáveis, o acetato etílico tem de apresentar pelo *Menos* qualidade espectrofotométrica e a fonte de azoto, se utilizada, não pode contaminar os tubos de evaporação com óleo ou humidade. (A utilização de um ardil contendo sulfato de cálcio ajuda a prevenir essa contaminação.) Para verificar a pureza destes reagentes, que não são fornecidos com o kit, recomendamos o

processamento periódico de um "ensaio sem solventes". Este procedimento implica a preparação e o ensaio de água destilada ou esterilizada da forma prescrita para as amostras de urina, de modo a confirmar que produz uma concentração aparente de aldosterona essencialmente de zero, ou seja, inferior ao limite de detecção do ensaio.

Valores de Referência

Os seguintes níveis de aldosterona para o soro (ou plasma) baseiam-se na ingestão normal de sódio. Note-se que os níveis normais de aldosterona no soro ou no plasma dependem da ingestão de sódio e de o doente estar em pé ou deitado. Uma elevada ingestão de sódio suprime geralmente a aldosterona do soro, enquanto que uma baixa ingestão de sódio aumenta o nível de aldosterona no soro.

Em pé	4–31 ng/dL
Deitado	1–16 ng/dL

Foram obtidos os seguintes níveis de aldosterona na urina.

Dieta normal	6–25 µg/dia
Baixo teor de sal	17–44 µg/dia
Elevado teor de sal	0–6 µg/dia

Uma investigação completa da fisiopatologia da aldosterona tem de incluir igualmente uma avaliação da actividade da renina/angiotensina no plasma.

Laboratórios devem considerar estes resultados *como directrizes apenas*. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência.

Características do Ensaio

Ver Tabelas e Gráficos para dados *representativos* do desempenho do kit Coat-A-Coat Aldosterone. Os resultados de aldosterona nas secções abaixo são expressos em pg/mL. A *Menos* que especificado em contrário, todos os resultados foram gerados a partir de amostras de soro.

Factores de Conversão:

pg/mL $\times$ 2,775 $\rightarrow$ pmol/L

pg/mL $\div$ 10 $\rightarrow$ ng/dL

Calibração: 25 – 1 200 pg/mL

Sensibilidade Analítica: 11 pg/mL.

Precisão Intra-Ensaio (entre ensaios)

Foram calculadas estatísticas para cada uma de seis amostras a partir dos resultados de vinte pares de tubos num único ensaio. (Ver a tabela "Precisão Intra-Ensaio".)

Precisão Inter-ensaio (ensaio a ensaio)

Foram calculadas estatísticas para cada uma de seis amostras a partir dos resultados de pares de tubos em 20 ensaios diferentes. (Ver a tabela "Precisão Inter-Ensaio".)

Linearidade: As amostras foram doseadas sob várias diluições. (Consulte a tabela "Linearidade" para dados representativos.)

Efeito fim-de-série: Nenhum até aproximadamente 400 tubos. (Ver tabela "Efeito fim-de-série".)

Recuperação: Foram submetidas a ensaio amostras de 1 a 19 a que foram adicionadas três soluções de aldosterona (4 576, 8 347 e 15 071 pg/mL). (Ver tabela de "Recovery" para dados representativos.)

Especificidade: O anti-soro para o kit Coat-A-Count Aldosterone é muito específico da aldosterona, com uma reacção cruzada extremamente reduzida relativamente a outros compostos que possam estar presentes nas amostras de paciente. As reacções cruzadas foram calculadas numa base peso a peso, com uma ligação de aproximadamente 50%. (Ver a tabela "Especificidade" para ver dados representativos.)

Bilirrubina: A presença de bilirrubina em concentrações até 200 mg/L não tem efeito em resultados, dentro da precisão do ensaio.

Hemólise: A Presença de eritrócitos em concentrações até 30 μ L/mL não tem efeito no resultado, dentro da precisão do ensaio.

Lipémia: O calibrador de 600 pg/mL foi diluído em série com cada um de dois pools de soro lipémico, levando ao aumento do grau de lipémia à medida que

a concentração de aldosterona diminui (devido essencialmente ao calibrador). As diluições foram testadas através do procedimento Coat-A-Count Aldosterone, juntamente com os pools lipémicos sem qualquer adição. Os resultados demonstram recuperações excelentes, mesmo na presença de lipémia grave.

Tipo de amostra alternativa: Para determinar se os anticoagulantes interferem no ensaio, foi efectuada a colheita de sangue em 47 voluntários para tubos vacutainer lisos, heparinizados e com EDTA. Todas as amostras foram testadas através do procedimento Coat-A-Count Aldosterone. Os resultados foram submetidos a uma análise de regressão linear.

(Heparina) = 0,96 (Soro) – 3,0 pg/mL
 $r = 0,978$

Médias:
175 pg/mL (Heparina)
185 pg/mL (Soro)

(EDTA) = 1,04 (Soro) + 22 pg/mL
 $r = 0,985$

Médias:
214 pg/mL (EDTA)
185 pg/mL (Soro)

Os resultados mostram que o soro e o plasma heparinizado produzem resultados comparáveis, enquanto que o plasma de EDTA produz resultados em média 15% superiores.

Efeito das Proteínas: Para simular diversas concentrações de proteínas, foram efectuadas experiências em que alíquotas de 2,0 mL de pool de soro humano foram submetidas ao processo de congelamento-secagem e, em seguida, reconstituídas com diversos volumes de água (1,0, 1,3, 2,0, 3,0 e 4,0 mL). Cada alíquota reconstituída foi então testada através do procedimento Coat-A-Count Aldosterone. Note-se que as alíquotas reconstituídas com metade do volume original representam uma concentração proteica extremamente elevada, na ordem dos 14 g/dL. (O factor de correcção do volume de reconstituição encontra-se representado em tabela, em baixo.) Estes resultados indicam que mesmo grandes variações no teor de proteínas têm um efeito relativamente reduzido sobre o ensaio Coat-A-Count Aldosterone.

Comparação de métodos 1: Duzentos e trinta e seis amostras de soro, com concentrações de aldosterona entre 27 e 860 pg/mL, foram submetidas simultaneamente a ensaio através do procedimento corrente do Coat-A-Count Aldosterone (incubação durante 18 horas à temperatura ambiente) e pelo procedimento anterior (incubação durante 3 horas a 37°C). (ver o gráfico "Comparação de Métodos 1") Por regressão linear.

$(\text{Corrente}) = 1,0 (\text{Anterior}) - 8,4 \text{ pg/mL}$
 $r = 0,985$

Médias:
130 pg/mL (Corrente)
138 pg/mL (Anterior)

Comparação de métodos 2: Noutro estudo, 84 amostras de urina, com concentrações de aldosterona entre 26 e 228 pg/mL, foram submetidas simultaneamente a ensaio através do procedimento corrente do Coat-A-Count Aldosterone (incubação durante 18 horas à temperatura ambiente) e pelo procedimento anterior (incubação durante 3 horas a 37°C). (ver o gráfico "Comparação de Métodos 2") Por regressão linear.

$(\text{Corrente}) = 1,0 (\text{Anterior}) + 5,9 \text{ pg/mL}$
 $r = 0,953$

Médias:
85 pg/mL (Corrente)
77 pg/mL (Anterior)

Assistência Técnica

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

O Sistema de Qualidade da Diagnostic Products Corporation está registado sob ISO 13485:2003.

DPC®

Diagnostic Products Corporation
Corporate Offices
5210 Pacific Concourse Drive
Los Angeles, CA 90045-6900
USA

2005-03-18

PITKAL – 4



EC REP DPC Biemann GmbH
61231 Bad Nauheim
Germany
+49 -6032-994-00