
ALDOCTK-2
(P2714)

DiaSorin

English.....	p. 1
Italiano.....	p. 11
Français.....	p. 21
Deutsch.....	p. 32
Español.....	p. 42
Português.....	p. 52
Svenska.....	s. 62
Dansk.....	s. 71
Magyar.....	s. 81
Česky.....	p. 91
Ελληνικά.....	p. 101

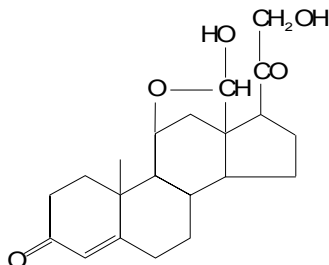
ALDOSTERONE RADIOIMMUNOASSAY KIT

Procedure for quantitative determination of aldosterone in human serum, plasma or urine samples

For in vitro use only

1. INTRODUCTION

Aldosterone is a steroid hormone of molecular weight 360.4 daltons, having the following chemical formula:



Aldosterone is secreted by the zona glomerulosa of the adrenal cortex. It is by far the most potent regulator of electrolyte excretion.

Aldosterone binds to specific protein receptors in the responsive renal cells, where it probably induces the DNA-directed synthesis of mRNA with subsequent formation of new protein. The role of this protein remains controversial, but it may either facilitate entry of sodium into the transporting cells or provide these cells with an increased energy supply for active sodium transport. In either case, its net effect is to enhance sodium transport (reabsorption).

In the distal nephron, the action of aldosterone is manifested by increased reabsorption of sodium and chloride ions from the tubular lumen and increased secretion of potassium and hydrogen ions into the tubular lumen. The reabsorption of sodium and chloride tends to increase the osmolality of extracellular fluid. An increase in extracellular osmolality stimulates the secretion of ADH and ADH facilitates the renal conservation of water. Sodium, chloride, and water are commonly retained or excreted together, and aldosterone can be said to promote, indirectly, the renal tubular reabsorption of water.

The mechanism regulating the secretion of aldosterone responds to changes in body hydration. The renin-angiotensin system is the principal mediator of the adrenocortical response to changes in body hydration. Conditions that reduce extracellular fluid volume, and conditions that result in sequestration of venous blood, all tend to stimulate the production of renin, thereby increasing the formation of angiotensin. Angiotensin not only acts directly on the vascular system as a pressor agent, but also stimulates the adrenal cortex to secrete aldosterone.

Aldosterone secretion is also influenced by:

1. Potassium concentration in body fluids: potassium depletion decreases, while potassium retention increases aldosterone secretion.
2. ACTH secretion.
3. Sodium concentration in body fluids: sodium depletion increases, while sodium retention decreases aldosterone secretion.

The assay of aldosterone may be carried out both in serum or plasma and in 24-hour urine. From a clinical point of view it must be remembered that, while the 24-hour urinary measurement of 18-oxo-conjugate of aldosterone is an integrated reflection of the daily aldosterone secretion, the plasma values may reflect only a single point in time and since plasma aldosterone shows typical bursts, which follow a circadian rhythm, it might not be safe to draw valid conclusions from a single determination. Therefore, while plasma aldosterone measurement is more suitable for acute studies (like circadian rhythms, postural changes, acute effect of drugs), the 24-hour urinary measurement is the method of choice for clinical investigation.

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The principle of the assay is based on the competition between labelled aldosterone and aldosterone contained in calibrators or samples to be assayed for a fixed and limited number of antibody binding sites. After the incubation, the amount of labelled aldosterone bound to the antibody on the tube walls is inversely related to the concentration of unlabelled aldosterone present in calibrators or samples. The method adopted for B/F separation is based on the use of antibody-coated tubes, where the antibody is coated on the tube walls.

3. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

Coated tubes	100
¹²⁵ I-labelled aldosterone	1 bottle
Aldosterone calibrators	6 vials
Control serum	1 vial
Number of tubes	100

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Once opened, the reagents of this kit are stable until the kit expiry date when properly stored. The kit has been designed to perform 2 assay runs if reagents are stored as the manufacturer recommends.

Reagents should not be used past the expiry date. The expiry date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiry date of the tracer. The expiry date of each component is reported on the respective vial label.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming.

Reagents from different batches must not be mixed.

3.1. Coated tubes

The inner surface of each tube is coated with aldosterone antiserum raised in rabbits.

Before use, bring the coated tubes to room temperature prior to opening the box, to avoid condensation of humidity.

Securely reseal the box containing unused tubes. Do not mix different batches of coated tubes.

3.2. ¹²⁵I-labelled aldosterone (red): ready-to-use reagent

The bottle contains 52 mL aldosterone labelled with ¹²⁵I, steroid-free human serum, phosphate buffer, preservatives and an inert red dye. Radioactivity is 85 kBq (2.3 µCi) or less on the calibration date.

3.3. Aldosterone calibrators

The vials contain increasing amounts of aldosterone, steroid-free human serum and preservatives. The zero calibrator vial contains 3 mL solution.

Reconstitute the contents of the 1-5 calibrator vials with 1 mL distilled water. The resulting solutions contain 50 - 100 - 250 - 500 - 1000 pg/mL aldosterone (0.138 - 0.277 - 0.692 - 1.385 - 2.770 nmol/L) and are stable for one week at 2-8°C or stored in deep-frozen aliquots (-20°C or below) for extended storage.

As no international standard preparation is currently available, the kit calibrators are referenced to an internal reference preparation (99% purity by HPLC). *The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as the manufacturer recommends.*

3.4. Control serum: lyophilized reagent

The vial contains aldosterone, human serum and preservatives. The range of concentrations of each control is reported on the certificate of analysis and indicates the limits established by DiaSorin for control values that can be obtained in reliable assay runs.

Reconstitute the vial contents with 1 mL distilled water. The resulting solution is stable for one week at 2-8°C or stored in deep-frozen aliquots (-20°C or below) for extended storage.

4. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

- Distilled or deionized water.
- Laboratory reagents (HCl, boric acid) for urine assay.
- Glassware.
- Disposable glass tubes.
- Test tube rack.
- Micropipettes with disposable tips (10, 200, 500 µL) (10 µL: trueness ± 3%, precision 2%; 200, 500 µL: trueness ± 2%, precision 1%).
- Vortex mixer.
- Thermostatically-controlled water bath or heating block capable of maintaining 37° ± 1°C.
- Device for aspiration of incubation mixture.
- Gamma counter suitable for counting ¹²⁵I (counter window setting: 15-80 keV - counter efficiency: 70% - counting time: 1 min). If counter efficiency is below 60%, counting time should be prolonged to 2 min.

5. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Careful standardization of the patient's preparation and sampling conditions is strongly recommended.

Serum or plasma samples

The anticoagulants potassium EDTA and lithium heparin have been tested and may be used with this assay (see §9.1). Blood should be collected aseptically by venipuncture, allowed to clot, and the serum separated from the clot as soon as possible. Samples having particulate matter, turbidity, lipaemia, or erythrocyte debris may require clarification by filtration or centrifugation before testing. Grossly haemolyzed or lipaemic samples as well as samples containing particulate matter or exhibiting obvious microbial contamination should not be tested. If the assay is performed within 24 hours of sample collection, the samples should be kept at 2-8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20°C or below). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

If aldosterone levels greater than 1000 pg/mL are expected, the samples should be diluted with the zero calibrator.

Urine samples

Collect 24-hour urine, measure and record the volume. Mix well before withdrawing an aliquot to be assayed. Add 1 g boric acid/100 mL and store at 2-8°C for one day or in deep-frozen aliquots (-20°C or below) for extended storage.

Urine hydrolysis

Aldosterone can be assayed in urine samples after acid hydrolysis of aldosterone 18-glucuronide. In the conditions recommended for the assay, hydrolysis is complete.

- **Mix 100 µL urine and 1 mL 0.1N HCl.** Use glass tubes.
- Cap tubes and **incubate overnight (18-22 hours) at 30 ± 2°C.**

6. ASSAY PROCEDURE

Bring all reagents to room temperature (20-25°C) before assaying. Perform the assay at least in duplicate. Calibrators must be run with each series of patient specimens. Calibrators and samples should be subjected to the same process and incubation time.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each calibrator and sample.

- Dispense reagents *in the bottom of coated tubes*. Operate according to the following scheme:

reagents \ tubes	Zero calibrator	Calibrators 1-5	Serum samples	Urine samples
Zero calibrator	200 µL	–	–	200 µL
Calibrators 1-5	–	200 µL	–	–
Serum samples	–	–	200 µL	–
Urine samples	–	–	–	10 µL*
Tracer	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

* 20 µL hydrolyzed urine should be used for urine samples that are expected to contain low aldosterone levels.

- **Mix** the contents of tubes with a Vortex and **incubate overnight** (18-22 hours) **at room temperature**.
- Carefully **aspirate** the incubation mixture. *Be sure that the aspirator tip touches the bottom of the coated tube so that all the liquid is removed. Failure to remove adhering solution adequately may result in poor reproducibility and spurious results. No trace of dye should still be visible.*
- **Measure the radioactivity** of tubes.

7. CALCULATION OF RESULTS

Compute the mean net counts for each group of tubes. Compute the B/Bo ratio for each calibrator and unknown sample as follows:

$$B/Bo\% = \frac{\text{calibrator or sample mean counts}}{\text{zero calibrator mean counts}} \times 100$$

Plot in semilog or linear-linear coordinates the mean percent value for each calibrator on the ordinate (y axis) as a function of aldosterone concentration expressed as pg/mL or nmol/L on the abscissa (x axis). A calibration curve is thus obtained (Fig. 1).

Serum or plasma samples

Read the aldosterone concentration of each sample expressed as pg/mL or nmol/L directly from the calibration curve. If the sample was diluted, the aldosterone concentration value derived from the diluted specimen must be multiplied by the dilution factor.

Urine samples

Daily aldosterone excretion expressed as µg or nmol/24 hours is calculated by the following procedure.

- *For a 10-µL sample volume of hydrolyzed urine*
Multiply the value read from the calibration curve by 220 to obtain urinary aldosterone concentration in pg/mL or nmol/L. The coefficient of 220 derives from the dilution factor of hydrolyzed urine (11), multiplied by the calibrator-to-sample ratio (20).
- *For a 20-µL sample volume of hydrolyzed urine*
Multiply the value read from the calibration curve by 110 to obtain urinary aldosterone concentration in pg/mL or nmol/L. The coefficient of 110 derives from the dilution factor of hydrolyzed urine (11), multiplied by the calibrator-to-sample ratio (10).

To obtain the daily aldosterone excretion concentration, multiply the aldosterone concentration by the volume of urine excreted (expressed in mL) using the following formulae:

$$\begin{aligned} \mu\text{g}/24 \text{ hours} &= \text{pg/mL} \times \text{mL urine excreted} \times 10^{-6} \\ \text{nmol}/24 \text{ hours} &= \text{nmol/L} \times \text{mL urine excreted} \times 10^{-3} \end{aligned}$$

Calculation example

The following data must only be considered an example and should not be employed instead of the data obtained by the user.

Description	cpm	B/Bo x 100
Zero calibrator	10,220	100
50 pg/mL - 0.138 nmol/L	8,534	83.5
100 pg/mL - 0.277 nmol/L	7,409	72.5
250 pg/mL - 0.692 nmol/L	5,243	51.3
500 pg/mL - 1.385 nmol/L	3,352	32.8
1,000 pg/mL - 2.770 nmol/L	1,942	19.0
Serum sample	6,805	66.8
Urine sample	8,262	81.0

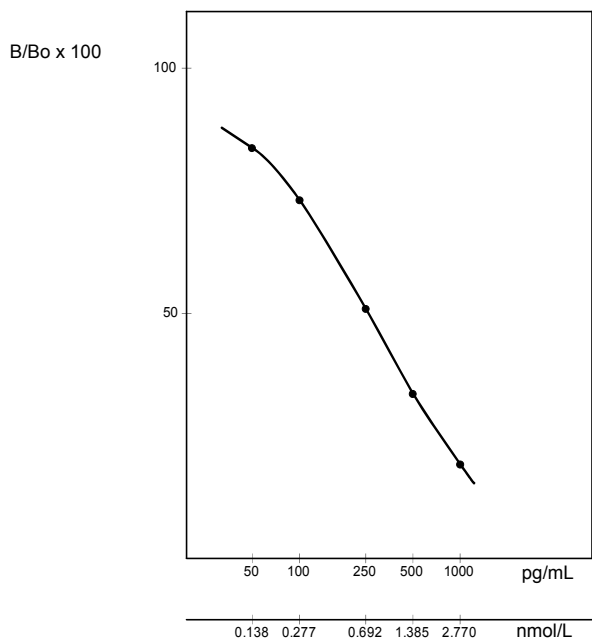
Serum sample

By interpolation from the calibration curve, the sample is found to contain 140 pg/mL (0.388 nmol/L) aldosterone.

Urine sample

By interpolation from the calibration curve, the sample is found to contain 70 pg/mL (0.194 nmol/L) aldosterone. Taking into consideration the factor 220 and the volume of urine excreted during 24 hours (e.g. 1100 mL), the daily aldosterone excretion is calculated as follows:

$$\begin{aligned} \mu\text{g}/24 \text{ hours} &= 70 \times 220 \times 1100 \times 10^{-6} = 15400 \times 1100 \times 10^{-6} = 16.94 \\ \text{nmol}/24 \text{ hours} &= 0.194 \times 220 \times 1100 \times 10^{-3} = 42.68 \times 1100 \times 10^{-3} = 46.95 \end{aligned}$$



ALDOSTERONE

Fig. 1

8. EXPECTED VALUES

The ranges given below are merely indicative for a normal population with a sodium intake of 100-150 mEq/24 hours: each laboratory should establish its own reference ranges.

Normal subjects	PLASMA, pg/mL	URINE, µg/24 hours
Supine position	7.5 - 150	2.8 - 30.0
Upright position	35 - 300	

Conversion to nmol aldosterone/L is possible using the following formula:

$$\text{nmol aldosterone/L} = \text{pg aldosterone/mL} \times 2.77 \times 10^{-3}$$

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1. Analytical specificity

Analytical specificity may be defined as the ability of the assay to accurately detect specific analyte in the presence of potentially interfering factors in the sample matrix (e.g., anticoagulants, haemolysis, effects of sample treatment), or cross-reactive analytes.

Interference. Controlled studies of potentially interfering substances or conditions showed that the assay performance was not affected by lipaemia (up to 500 mg/dL triglycerides), bilirubinaemia (up to 20 mg/dL bilirubin). Aldosterone values determined in samples containing 200 mg/dL haemoglobin are about 10% higher than those determined in normal samples.

Matched serum and plasma samples (the latter obtained with lithium heparin and potassium EDTA) were drawn from 41 healthy volunteers to set up an anticoagulant interference study. All samples were tested by the standard method and the following results were observed.

#	Sample	Serum	Heparin	EDTA
41	mean (pg/mL)	181.6 (100%)	183.9 (101.3%)	197.1 (108.5%)

The results of those tests showed that aldosterone values determined in potassium EDTA plasma samples were about 10% higher than those determined in serum or lithium heparin plasma samples.

Cross-reactions. The percentage of cross-reactions, calculated according to Abraham, shows the specificity of the antiserum used.

- Aldosterone	100%
- 3 beta, 5 alpha-tetrahydroaldosterone	4.2%
- 3 alpha, 5 beta-tetrahydroaldosterone	0.3%
- Cortisolone	$6.4 \times 10^{-3}\%$
- 18-OH-deoxycorticosterone	$5.0 \times 10^{-3}\%$
- Corticosterone	$4.0 \times 10^{-3}\%$
- Cortisone	$2.5 \times 10^{-3}\%$
- Deoxycorticosterone	$1.0 \times 10^{-3}\%$
- Testosterone	$8.0 \times 10^{-4}\%$
- Prednisolone	$6.4 \times 10^{-4}\%$
- Cortisol	$1.0 \times 10^{-4}\%$
- Progesterone	$8.0 \times 10^{-5}\%$
- Spironolactone	$6.5 \times 10^{-5}\%$
- Dehydroepiandrosterone	$6.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnenolone	$5.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnanetriol	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Dexamethasone	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Estradiol	$1.0 \times 10^{-6}\%$

9.2. Analytical sensitivity

Analytical sensitivity may also be expressed as the limit of detection, which is the minimal amount of specific analyte detectable by the assay. The limit of detection is 10 pg/mL (0.0275 nmol/L) at 95% confidence limit. This was calculated as the apparent concentration of analyte which was distinguishable from the zero calibrator, that is, two standard deviations below zero.

9.3. Precision

Different sample pools, containing different concentrations of specific analyte, were assayed to determine repeatability and reproducibility of the assay (i.e., within- and between-assay variability).

Repeatability	A	B	C
Number of determinations	10	10	10
Mean (pg/mL)	86.4	249.9	495.6
Standard deviation	4.60	9.50	8.60
Coefficient of variation (%)	5.3	3.8	1.7

Reproducibility	A	B	C
Number of determinations	15	15	15
Mean (pg/mL)	91.3	230.3	607.5
Standard deviation	5.72	7.90	26.40
Coefficient of variation (%)	7.0	3.4	4.3

9.4. Trueness

The assay trueness has been checked by the dilution and recovery tests.

Dilution test. Two sera with high aldosterone concentration were tested after serially diluting with the zero calibrator.

Dilution	Expected concentration, pg/mL	Measured concentration, pg/mL	% Recovery
neat	–	706.0	–
1:2	353.0	360.5	102.1
1:4	176.5	167.7	95.0
1:8	88.3	92.7	105.0
1:16	44.1	43.0	97.5
neat	–	355.0	–
1:2	177.5	165.0	93.0
1:4	88.8	92.7	104.5
1:8	44.4	46.0	103.7
1:16	22.2	25.7	115.8

Recovery test. Two sera containing aldosterone were tested as such and after mixing with increasing amounts of aldosterone.

Added concentration, pg/mL	Expected concentration, pg/mL	Measured concentration, pg/mL	% Recovery
–	–	147.0	–
520	659.7	713.0	108.1
300	439.7	469.0	106.7
180	319.7	305.0	95.4
40	179.7	177.0	98.5
–	–	291.0	–
520	796.5	815.0	102.3
300	576.5	573.0	99.4
180	456.5	435.0	95.3
40	316.5	321.0	101.4

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The clinical significance of aldosterone determination is invalidated when the subjects are not kept under controlled conditions of sodium and potassium intake and controlled conditions of posture or when drugs are administered (e.g., diuretics, clonidine, betablocking agents, reserpine, alpha-methyldopa, etc.).

Diagnosis should not be established on the basis of a single test result, but should be determined in conjunction with clinical findings and other diagnostic procedures as well as in association with medical judgement.

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimens may affect the assay results.

A skillful technique and strict adherence to the instructions are necessary to obtain reliable results. In particular, precise pipetting and accurate aspiration are essential.

Non-reproducible results may arise from methodological factors, such as:

- cross-exchange of vial caps
- use of the same tip when withdrawing from different vials or dispensing different samples
- leaving the vials open for long
- exposure of reagents or samples to intense heat or heavy sources of bacterial contamination
- inadequate aspiration of incubation mixture
- contamination of tube rims by tracer or samples
- casual oscillations or inadequate handling of the gamma counter
- use of reagents from different master batches.

11. WARNINGS AND PRECAUTIONS

All serum and plasma units used to produce the components provided in this kit have been tested for the presence of HBsAg, anti-HCV, and anti-HIV-1/2 and found to be non-reactive. However, as no test method can offer absolute assurance that pathogens are absent, all specimens of human origin should be considered potentially infectious and handled with care.

12. SAFETY PRECAUTIONS

- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in the assay laboratory.
- Do not pipette solutions by mouth.
- Avoid direct contact with all potentially infectious materials by using protective clothing such as lab coats, protective glasses and disposable gloves. Wash hands thoroughly at the end of each assay.
- Avoid splashing or forming an aerosol. Any reagent spills should be washed with a 5% sodium hypochlorite solution and disposed of as though potentially infectious.
- All samples, biological reagents and materials used in the assay must be considered potentially able to transmit infectious agents. They should therefore be disposed of in accordance with the prevailing regulations and guidelines of the agencies holding jurisdiction over the laboratory, and the regulations of each Country. Disposable materials must be incinerated; liquid waste must be decontaminated with sodium hypochlorite at a final concentration of 5% for at least half an hour. Any materials to be reused must be autoclaved using an *overkill* approach (USP 24, 2000, p. 2143). A minimum of one hour at 121°C is usually considered adequate, though the users must check the effectiveness of their decontamination cycle by initially validating it and routinely using biological indicators.

13. BASIC RULES OF RADIATION SAFETY

Reagents Containing Iodine-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 2.17 μCi (81 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed, and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories, or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use, and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer, and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

SCHEME OF THE ASSAY

- 1 - DIRECTLY ASSAY SERUM OR PLASMA SAMPLES.
HYDROLYZE URINE SAMPLES WITH 0.1N HCl OVERNIGHT AT 30°C.
- 2 - RECONSTITUTE REAGENTS. IDENTIFY COATED TUBES IN DUPLICATE.
- 3 - DISPENSE REAGENTS ACCORDING TO THE FOLLOWING SCHEME AND MIX THE INCUBATION MIXTURE:

REAGENTS \ TUBES	0 CAL	CAL 1-5	SERUM SAMPLES	URINE SAMPLES
ZERO CALIBRATOR	200 µL	–	–	200 µL
CALIBRATORS 1-5	–	200 µL	–	–
SERUM SAMPLES	–	–	200 µL	–
URINE SAMPLES	–	–	–	10 µL*
TRACER	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

- 4 - INCUBATE OVERNIGHT AT ROOM TEMPERATURE.
- 5 - ASPIRATE THE REACTION MIXTURE.
- 6 - MEASURE THE RADIOACTIVITY OF TUBES.

* 20 µL in case of low aldosterone levels.

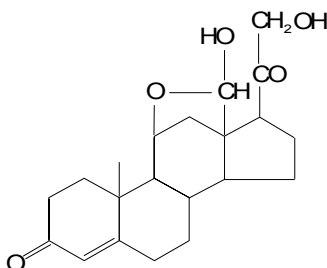
KIT PER IL DOSAGGIO RADIOIMMUNOLOGICO DELL'ALDOSTERONE

Procedimento per l'analisi quantitativa dell'aldosterone in campioni di siero, plasma o urina umani

Solo per uso in vitro

1. INTRODUZIONE

L'aldosterone è un ormone steroideo di peso molecolare 360,4 dalton, con la seguente formula chimica:



L'aldosterone è secreto dalla zona glomerulare della corteccia surrenale. È di gran lunga il più potente regolatore dell'escrezione di elettroliti nelle urine.

L'aldosterone si lega a recettori specifici ormonali nelle relative cellule renali dove probabilmente induce la sintesi di RNA messaggero con conseguente formazione di nuova proteina. Il ruolo di questa proteina è controverso, ma si pensa che faciliti l'entrata del sodio nelle cellule vettrici oppure fornisca a queste cellule una maggiore energia per il trasporto attivo di sodio. In entrambi i casi il suo effetto si manifesta con un aumento del trasporto di sodio (riassorbimento).

Nel nefrone distale, l'azione dell'aldosterone si manifesta con un aumento del riassorbimento di ioni sodio e cloro dal lume tubulare e con un aumento dell'eliminazione di ioni potassio e idrogeno nel lume tubulare. Il riassorbimento di ioni sodio e cloro tende ad aumentare l'osmolalità del liquido extracellulare. L'aumento dell'osmolalità extracellulare stimola la secrezione di ADH e l'ADH a sua volta facilita la ritenzione di acqua da parte del rene. Ioni sodio, cloro e acqua sono generalmente trattenuti o escreti insieme: pertanto si può dire che l'aldosterone stimola, indirettamente, il riassorbimento d'acqua a livello dei tubuli renali.

Il meccanismo che regola la secrezione d'aldosterone risponde alle modificazioni dell'idratazione corporea. Il sistema renina-angiotensina è il principale mediatore dell'idratazione corporea. Le situazioni che riducono il volume di liquido extracellulare e quelle che risultano nel sequestro del sangue venoso tendono a stimolare la produzione di renina, e quindi quella di angiotensina. L'angiotensina agisce direttamente sul sistema vascolare come agente pressorio e inoltre stimola la secrezione di aldosterone dalla corteccia surrenale.

La secrezione di aldosterone è influenzata direttamente anche da:

1. Variazioni della concentrazione plasmatica o tissutale di potassio: l'ipopotassiemia deprime, mentre l'iperpotassiemia stimola la secrezione di aldosterone.
2. Secrezione di ACTH.
3. Variazioni della concentrazione plasmatica o tissutale di sodio: l'iposodiemia stimola, mentre la ipersodiemia deprime la secrezione di aldosterone.

Il dosaggio dell'aldosterone può essere eseguito nel plasma o siero e nelle urine delle 24 ore.

Tenendo conto del rapido ritmo catabolico dell'aldosterone, il suo dosaggio nel plasma è molto utile nella valutazione delle variazioni acute (ritmo circadiano, cambiamenti di posizione, stimolazioni e inibizioni di breve durata). Da un punto di vista clinico occorre sottolineare però che i valori plasmatici di aldosterone riflettono solo la condizione ad un dato momento della giornata. Poiché la secrezione dell'aldosterone plasmatico ha un andamento episodico che segue un ritmo circadiano, può non essere valido trarre conclusioni da una determinazione singola. La determinazione dell'aldosterone nelle urine delle 24 ore riflette integralmente la situazione secretoria giornaliera, mentre la determinazione dell'aldosterone plasmatico è più adatta per studi mirati.

2. PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il principio del dosaggio consiste nella competizione tra aldosterone marcato e aldosterone contenuto nei calibratori o nei campioni per il numero fisso e limitato di siti anticorpali. Dopo l'incubazione, la quantità di aldosterone marcato legata all'anticorpo fissato alle provette sensibilizzate è inversamente proporzionale alla concentrazione di aldosterone non marcato presente nei calibratori o nei campioni. Il metodo adottato per la separazione libero/legato è basato sull'impiego delle provette sensibilizzate, dove l'anticorpo è fissato alle pareti delle provette.

3. REATTIVI FORNITI NEL KIT

Provette sensibilizzate	100
Aldosterone marcato con ¹²⁵ I	1 flacone
Calibratori di aldosterone	6 flaconi
Siero di controllo	1 flacone
Numero di dosaggi	100

MODALITÀ DI CONSERVAZIONE: Al momento dell'arrivo, conservare il kit a 2-8°C. Non congelare. Dopo l'apertura, i reattivi di questo kit sono stabili fino alla data di scadenza del kit se conservati in modo adeguato. Il kit è garantito per 2 serie analitiche se i reattivi sono conservati secondo quanto raccomandato dal fabbricante.

Non usare i reattivi oltre la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e corrisponde alla data di scadenza del tracciante. La data di scadenza di ciascun componente è riportata sulle etichette dei rispettivi flaconi.

Nel ricostituire il contenuto dei flaconi, agitare delicatamente per evitare la formazione di schiuma. Non mescolare reattivi provenienti da lotti differenti.

3.1. Provette sensibilizzate

La superficie interna di ciascuna provetta è rivestita con antisiero da coniglio anti-aldosterone.

Al momento dell'uso, portare le provette sensibilizzate a temperatura ambiente prima di aprire il contenitore, per evitare condensazione di umidità.

Le provette non utilizzate vanno conservate nel contenitore ben chiuso. Non mescolare lotti differenti di provette sensibilizzate.

3.2. Aldosterone marcato con ¹²⁵I (rosso): reattivo pronto per l'uso

Il flacone contiene 52 mL di aldosterone marcato con ¹²⁵I, siero umano deprivato di steroidi, tampone fosfato, conservanti e un colorante rosso inerte. La radioattività massima è 85 kBq (2,3 µCi) alla data di taratura.

3.3. Calibratori di aldosterone

Ogni flacone contiene quantità crescenti di aldosterone, siero umano deprivato di steroidi e conservanti. Il volume del calibratore zero è 3 mL.

Ricostituire il contenuto dei calibratori 1-5 con 1 mL di acqua distillata. Le soluzioni risultanti conterranno rispettivamente 50 - 100 - 250 - 500 - 1000 pg/mL (0,138 - 0,277 - 0,692 - 1,385 - 2,770 nmol/L) e sono stabili per una settimana a 2-8°C oppure suddivise in aliquote a -20°C o a temperature inferiori per una più lunga conservazione.

Poiché non è attualmente disponibile uno standard internazionale, i calibratori del kit sono tarati contro una preparazione di riferimento interna (pura al 99% in HPLC). *I calibratori del kit sono commutabili con i campioni in esame quando sono utilizzati con i reattivi e la procedura operativa di questo test diagnostico in vitro, secondo quanto raccomandato dal fabbricante.*

3.4. Siero di controllo: reattivo liofilo

Il flacone contiene aldosterone, siero umano e conservanti. Il range delle concentrazioni di ogni controllo è riportato sul certificato di analisi ed indica i limiti stabiliti da DiaSorin per i valori di controllo ottenibili in sessioni di analisi affidabili.

Ricostituire il contenuto del flacone con 1 mL di acqua distillata. La soluzione risultante è stabile per una settimana a 2-8°C oppure suddivisa in aliquote a -20°C o a temperature inferiori per una più lunga conservazione.

4. ATTREZZATURE E REATTIVI AUSILIARI

- Acqua distillata e deionizzata.
- Reattivi di laboratorio per il dosaggio di urina (HCl, acido borico).
- Vetreria.
- Provette in vetro monouso.
- Portaprovette.
- Micropipette con puntali monouso da 10 µL (esattezza ± 3%, precisione 2%) e 200, 500 µL (esattezza ± 2%, precisione 1%).
- Agitatore Vortex.
- Sistema termostatico in grado di mantenere 37° ± 1°C.
- Sistema per aspirare la miscela di incubazione.
- Contatore gamma per contare lo iodio ¹²⁵I (impostazione della finestra del contatore: 15-80 keV - efficienza del contatore: 70% - tempo di conteggio: 1 min). Se l'efficienza del contatore è inferiore al 60%, si deve prolungare il tempo di conteggio a 2 min.

5. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Si raccomanda di standardizzare accuratamente la preparazione del paziente e le condizioni di prelievo del campione.

Campioni di siero o plasma

Possono essere utilizzati anticoagulanti come litio eparina e potassio EDTA (vedi §9.1). Prelevare il sangue per puntura venosa, lasciarlo coagulare e separare il siero dal coagulo al più presto. Chiarificare per filtrazione o centrifugazione prima del test i campioni che presentano materiale in sospensione, opalescenza, lipemia o residui eritrocitari. Non usare campioni fortemente emolizzati o lipemici, né campioni che presentano materiale in sospensione o evidente contaminazione microbica. Se il dosaggio è eseguito nelle 24 ore successive al prelievo, i campioni possono essere conservati a 2-8°C. In caso contrario, devono essere suddivisi in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori. Se i campioni sono stati scongelati, agitare con cura prima di dosarli. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

Se si prevedono livelli di aldosterone maggiori di 1000 pg/mL, diluire con il calibratore zero.

Campioni di urina

Raccogliere le urine delle 24 ore e misurarne il volume. Mescolare accuratamente prima di prelevare un'aliquota per l'analisi. Aggiungere acido borico (1 g/100 mL di urina) e conservare a 2-8°C se il dosaggio viene effettuato nelle 24 ore oppure congelare in aliquote a -20°C o a temperature inferiori per periodi più lunghi.

Idrolisi dell'urina

L'aldosterone può essere dosato nei campioni di urina dopo idrolisi acida dell'aldosterone 18-glucuronato. Nelle condizioni raccomandate l'idrolisi è completa.

- **Aggiungere** in provette di vetro **100 µL di urina** ed **1 mL di HCl 0,1 N**.
- Tappare le provette ed **incubare per 18-22 ore a 30 ± 2°C**.

6. PROCEDIMENTO OPERATIVO

Portare i reattivi a temperatura ambiente (20-25°C) prima del dosaggio. Prevedere determinazioni almeno in duplicato. Eseguire la determinazione dei calibratori per ogni serie di campioni analizzati. Il procedimento operativo deve essere rigorosamente identico per calibratori e campioni in esame.

Eseguire le fasi del dosaggio nell'ordine previsto, senza interruzioni.

Utilizzare un puntale monouso nuovo per dispensare calibratori e campioni.

- Distribuire i reattivi *sul fondo delle provette sensibilizzate*. Operare secondo lo schema seguente:

reattivi \ provette	Calibratore zero	Calibratori 1-5	Campioni (siero)	Campioni (urina idrolizzata)
Calibratore zero	200 µL	–	–	200 µL
Calibratori 1-5	–	200 µL	–	–
Campioni (siero)	–	–	200 µL	–
Campioni (urina idrolizzata)	–	–	–	10 µL*
Tracciante	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

* Per i campioni di urina con un basso livello di aldosterone, si suggerisce di impiegare un volume di urina idrolizzata di 20 µL.

- **Agitare** il contenuto delle provette su Vortex ed **incubare per 18-22 ore a temperatura ambiente**.
- **Aspirare** accuratamente la miscela di incubazione. *Verificare che l'eliminazione del liquido sia completa, assicurandosi che il puntale della pipetta di aspirazione tocchi il fondo delle provette sensibilizzate. La presenza di gocce aderenti alle pareti delle provette sensibilizzate può provocare scarsa riproducibilità o risultati non affidabili. Non deve restare traccia del colorante.*
- **Misurare la radioattività** delle provette.

7. CALCOLO DEI RISULTATI

Calcolare la media dei conteggi per ogni gruppo di provette dopo aver sottratto il valore del fondo. Esprimere la media dei conteggi di calibratori e campioni come percentuale rispetto al calibratore zero:

$$B/Bo\% = \frac{\text{conteggio medio calibratori o campioni}}{\text{conteggio medio calibratore zero}} \times 100$$

Riportare su grafico semilog o lineare-lineare la percentuale media calcolata per ciascun calibratore sulle ordinate (asse delle y) in funzione della concentrazione di aldosterone espressa in pg/mL o nmol/L sulle ascisse (asse delle x). Si ottiene così una curva di taratura (Fig. 1).

Campioni di siero o plasma

Leggere direttamente dalla curva di taratura la concentrazione di aldosterone di ciascun campione espressa in pg/mL o nmol/L. Se il campione è stato diluito, la concentrazione di aldosterone trovata deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione.

Campioni di urina

Il calcolo dell'escrezione giornaliera di aldosterone espressa in µg o nmol/24 ore viene eseguito seguendo il procedimento seguente.

- *Per un campione di urina idrolizzata del volume di 10 µL*
Moltiplicare il valore letto dalla curva di taratura per 220, così da ottenere la concentrazione di aldosterone nell'urina espressa in pg/mL o in nmol/L. Il coefficiente 220 deriva dal fattore di diluizione dell'urina idrolizzata (11), moltiplicato per il rapporto calibratore/campione (20).
- *Per un campione di urina idrolizzata del volume di 20 µL*
Moltiplicare il valore letto dalla curva di taratura per 110, così da ottenere la concentrazione di aldosterone nell'urina espressa in pg/mL o in nmol/L. Il coefficiente 110 deriva dal fattore di diluizione dell'urina idrolizzata (11), moltiplicato per il rapporto calibratore/campione (10).

Per ottenere la concentrazione dell'escrezione giornaliera di aldosterone, moltiplicare la concentrazione di aldosterone per il volume di urina escreta (espresso in mL) secondo le seguenti formule:

$$\mu\text{g}/24 \text{ ore} = \text{pg/mL} \times \text{mL di urina escreta} \times 10^{-6}$$

$$\text{nmol}/24 \text{ ore} = \text{nmol/L} \times \text{mL di urina escreta} \times 10^{-3}$$

Esempio di calcolo

I dati seguenti devono essere considerati solo un esempio e non devono essere usati in luogo dei dati ottenuti dall'utilizzatore.

Descrizione	cpm	B/Bo x 100
Calibratore zero	10.220	100
50 pg/mL - 0,138 nmol/L	8.534	83,5
100 pg/mL - 0,277 nmol/L	7.409	72,5
250 pg/mL - 0,692 nmol/L	5.243	51,3
500 pg/mL - 1,385 nmol/L	3.352	32,8
1.000 pg/mL - 2,770 nmol/L	1.942	19,0
Campione (siero)	6.805	66,8
Campione (urina)	8.262	81,0

Campione di siero

Interpolando dalla curva di taratura, il campione risulta contenere 140 pg/mL (0,388 nmol/L) di aldosterone.

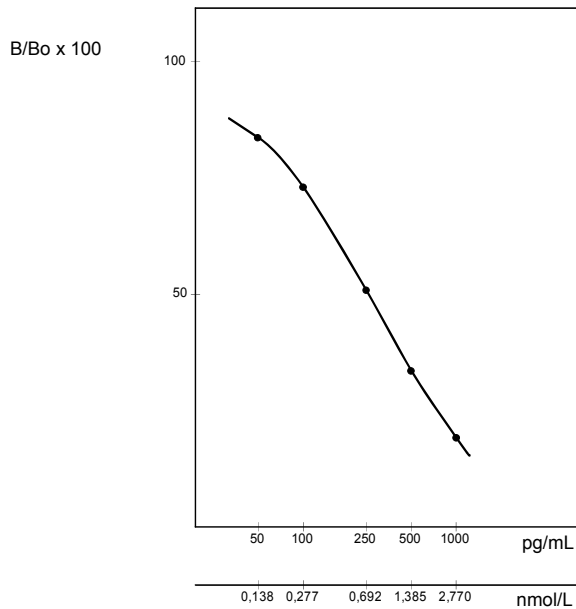
Campione di urina

Interpolando dalla curva di taratura, il campione risulta contenere 70 pg/mL (0,194 nmol/L) di aldosterone.

Tenendo conto del fattore 220 e del volume totale di urina raccolto nelle 24 ore (es. 1100 mL), l'escrezione giornaliera di aldosterone viene calcolata nel seguente modo:

$$\mu\text{g}/24 \text{ ore} = 70 \times 220 \times 1100 \times 10^{-6} = 15400 \times 1100 \times 10^{-6} = 16,94$$

$$\text{nmol}/24 \text{ ore} = 0,194 \times 220 \times 1100 \times 10^{-3} = 42,68 \times 1100 \times 10^{-3} = 46,95$$



ALDOSTERONE

Fig. 1

8. DATI CLINICI

Esaminando una popolazione di soggetti normali con un apporto sodico di 100-150 mEq/ 24 ore, si sono ottenuti i seguenti intervalli. Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire i propri intervalli di riferimento.

Soggetti normali	PLASMA, pg/mL	URINA, µg/24 ore
Posizione supina	7,5 - 150	2,8 - 30,0
Posizione eretta	35 - 300	

La conversione in nmol di aldosterone/L si esegue con la formula seguente:

$$\text{nmol aldosterone/L} = \text{pg aldosterone/mL} \times 2,77 \times 10^{-3}$$

9. PRESTAZIONI METODOLOGICHE DEL KIT

9.1. Specificità analitica

La specificità analitica è definita come la capacità del test di rilevare esattamente l'analita in presenza di fattori potenzialmente interferenti nella matrice del campione (per esempio, anticoagulanti, emolisi, effetti di trattamenti del campione) o di reazioni crociate con analiti potenzialmente interferenti.

Interferenze. Studi controllati su fattori potenzialmente interferenti hanno dimostrato che le prestazioni del test non sono influenzate da lipemia (fino a 500 mg/dL di trigliceridi), bilirubinemia (fino a 20 mg/dL di bilirubina). I valori di aldosterone ottenuti con campioni contenenti 200 mg/dL di emoglobina risultano circa del 10% superiori a quelli ottenuti con campioni normali.

Negli studi di interferenza degli anticoagulanti sono stati prelevati campioni di siero e di plasma (ottenuti con litio eparina e potassio EDTA) da 41 volontari sani. Tutti i campioni sono stati analizzati con il metodo standard, con i seguenti risultati:

N.	Campione	Siero	Eparina	EDTA
41	media (pg/mL)	181,6 (100%)	183,9 (101,3%)	197,1 (108,5%)

I risultati di queste analisi dimostrano che i valori di aldosterone ottenuti con i campioni di plasma contenenti potassio EDTA risultavano circa del 10% superiori a quelli ottenuti con i campioni di siero o di plasma contenenti litio eparina.

Reazioni crociate. Le percentuali di reazioni crociate, calcolate secondo Abraham, mostrano la specificità dell'antisiero usato.

- Aldosterone	100%
- 3 beta, 5 alfa-tetraidroaldosterone	4.2%
- 3 alfa, 5 beta-tetraidroaldosterone	0.3%
- Cortexolone	$6.4 \times 10^{-3}\%$
- 18-OH-desossicorticosterone	$5.0 \times 10^{-3}\%$
- Corticosterone	$4.0 \times 10^{-3}\%$
- Cortisone	$2.5 \times 10^{-3}\%$
- Desossicorticosterone	$1.0 \times 10^{-3}\%$
- Testosterone	$8.0 \times 10^{-4}\%$
- Prednisolone	$6.4 \times 10^{-4}\%$
- Cortisolo	$1.0 \times 10^{-4}\%$
- Progesterone	$8.0 \times 10^{-5}\%$
- Spironolattone	$6.5 \times 10^{-5}\%$
- Diidroepiandrosterone	$6.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnenolone	$5.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnatriolo	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Desametasone	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Estradiolo	$1.0 \times 10^{-6}\%$

9.2. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica può essere espressa anche come limite di rilevazione, ossia la quantità minima di analita rilevabile dal test. Il limite di rilevazione è 10 pg/mL (0,0275 nmol/L) al 95% di confidenza. È stato calcolato come la concentrazione apparente di analita distinguibile dal calibratore zero, ossia due deviazioni standard sotto lo zero.

9.3. Precisione

La ripetibilità e la riproducibilità del saggio (ossia la variabilità intra-saggio e inter-saggio) sono state determinate utilizzando dei campioni di riferimento a diverse concentrazioni di analita.

Ripetibilità	A	B	C
Numero di determinazioni	10	10	10
Media (pg/mL)	86,4	249,9	495,6
Deviazione standard	4,60	9,50	8,60
Coefficiente di variazione (%)	5,3	3,8	1,7

Riproducibilità	A	B	C
Numero di determinazioni	15	15	15
Media (pg/mL)	91,3	230,3	607,5
Deviazione standard	5,72	7,90	26,40
Coefficiente di variazione (%)	7,0	3,4	4,3

9.4. Esattezza

L'esattezza del dosaggio è stata controllata mediante i test di diluizione e recupero.

Test di diluizione. Sono state dosate diluizioni scalari di due sieri a concentrazione elevata di aldosterone effettuate nel calibratore zero.

Diluizione	Concentrazione attesa, pg/mL	Concentrazione misurata, pg/mL	% Recupero
in toto	–	706,0	–
1:2	353,0	360,5	102,1
1:4	176,5	167,7	95,0
1:8	88,3	92,7	105,0
1:16	44,1	43,0	97,5
in toto	–	355,0	–
1:2	177,5	165,0	93,0
1:4	88,8	92,7	104,5
1:8	44,4	46,0	103,7
1:16	22,2	25,7	115,8

Test di recupero. Sono stati dosati due sieri contenenti aldosterone, sia in toto sia dopo averli addizionati con quantità crescenti di aldosterone.

Concentrazione addizionata, pg/mL	Concentrazione attesa, pg/mL	Concentrazione misurata, pg/mL	% Recupero
–	–	147,0	–
520	659,7	713,0	108,1
300	439,7	469,0	106,7
180	319,7	305,0	95,4
40	179,7	177,0	98,5
–	–	291,0	–
520	796,5	815,0	102,3
300	576,5	573,0	99,4
180	456,5	435,0	95,3
40	316,5	321,0	101,4

10. LIMITI DEL DOSAGGIO

Il significato clinico della determinazione dei livelli di aldosterone può essere invalidato se l'introduzione giornaliera di sodio e potassio o la postura non vengono tenute sotto controllo, o quando vengano somministrati farmaci come diuretici, clonidina, agenti betabloccanti, reserpina, alfa-metildopa, etc.

La diagnosi non deve essere formulata sulla base del risultato di un singolo dosaggio, ma questo deve essere valutato insieme ad altri riscontri clinici, procedure diagnostiche e al giudizio del medico.

Contaminazione batterica o cicli ripetuti di congelamento/scongelamento dei campioni possono modificare i risultati del dosaggio.

Per ottenere risultati affidabili è necessario attenersi strettamente alle istruzioni per l'uso e possedere una adeguata manualità tecnica. In particolare è essenziale una buona precisione nella ricostituzione, distribuzione e aspirazione dei reattivi.

Risultati non riproducibili sono dovuti principalmente a fattori metodologici, come ad esempio:

- scambio di capsule tra i flaconi
- uso dello stesso puntale per i prelievi da flaconi diversi o da campioni diversi
- flaconi lasciati aperti per lunghi periodi di tempo
- esposizione dei reattivi o campioni a calore intenso o a forti sorgenti di inquinamento batterico
- aspirazione non adeguata della miscela di incubazione
- contaminazione del bordo delle provette con il tracciante o con i campioni
- oscillazioni casuali o cattiva manutenzione del contatore gamma
- scambio di reattivi provenienti da lotti diversi.

11. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Tutte le unità di siero e plasma utilizzate per la fabbricazione dei componenti di questo kit sono state analizzate e trovate non reattive per HBsAg, anti-HCV e per anti-HIV-1/2. Tuttavia, poiché nessun metodo può dare assoluta certezza che siano assenti agenti patogeni, tutto il materiale di origine umana dovrebbe essere considerato potenzialmente infettivo e manipolato come tale.

12. REGOLE DI SICUREZZA

- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici durante l'esecuzione del dosaggio.
- Non pipettare con la bocca.
- Evitare il contatto diretto con il materiale potenzialmente infetto indossando indumenti da laboratorio, occhiali protettivi e guanti monouso. Lavare accuratamente le mani al termine del dosaggio.
- Evitare di provocare schizzi o aerosol. Ogni goccia di reattivo biologico deve essere rimossa con una soluzione di sodio ipoclorito al 5% ed il mezzo utilizzato deve essere trattato come materiale di rifiuto infetto.
- Tutti i campioni, tutti i reattivi biologici del kit e tutti i materiali usati per effettuare il saggio devono essere considerati in grado di trasmettere agenti infettivi; pertanto i rifiuti devono essere smaltiti secondo le disposizioni legislative e la regolamentazione vigente in ciascun Paese. Il materiale monouso deve essere incenerito; i rifiuti liquidi devono essere decontaminati con sodio ipoclorito ad una concentrazione finale del 5% per almeno mezz'ora. Qualsiasi materiale che deve essere riutilizzato va trattato in autoclave con un approccio di *overkill* (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente si considera che un'ora a 121°C sia un tempo di sterilizzazione adeguato; tuttavia si raccomanda a ciascun utilizzatore di verificare l'efficacia del ciclo di decontaminazione mediante una convalida iniziale e l'uso routinario di indicatori biologici.

13. REGOLE DI BASE DI RADIOPROTEZIONE

Reagenti contenenti iodio-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 2,17 μCi (81 kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

SCHEMA DEL DOSAGGIO

- 1 - DOSARE DIRETTAMENTE I CAMPIONI DI SIERO O PLASMA.
IDROLIZZARE I CAMPIONI DI URINA CON HCl 0,1 N PER 18-22 ORE A 30°C.
- 2 - RICOSTITUIRE I REATTIVI. CONTRASSEGNARE LE PROVETTE SENSIBILIZZATE IN DUPLICATO.
- 3 - DISTRIBUIRE I REATTIVI SECONDO LO SCHEMA SEGUENTE ED AGITARE LA MISCELA DI INCUBAZIONE:

PROVETTE REATTIVI	CAL 0	CAL 1-5	CAMPIONI (SIERO)	CAMPIONI (URINA IDROLIZZ.)
CALIBRATORE ZERO	200 µL	–	–	200 µL
CALIBRATORI 1-5	–	200 µL	–	–
CAMPIONI (SIERO)	–	–	200 µL	–
CAMPIONI (URINA IDROLIZZATA)	–	–	–	10 µL*
TRACCIANTE	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

- 4 - INCUBARE PER 18-22 ORE A TEMPERATURA AMBIENTE.
- 5 - ASPIRARE LA MISCELA DI INCUBAZIONE.
- 6 - MISURARE LA RADIOATTIVITÀ DELLE PROVETTE.

* 20 µL per i campioni con bassi livelli di aldosterone.

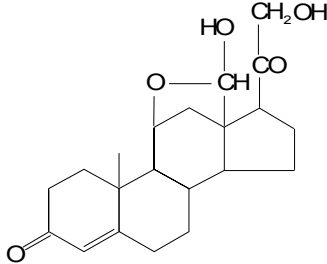
TROUSSE POUR LE DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'ALDOSTERONE

Technique pour la détermination quantitative de l'aldostérone dans le sérum, le plasma ou les urines humains

Usage in vitro

1. INTRODUCTION

L'aldostérone est une hormone stéroïde ayant un poids moléculaire de 360,4 daltons et la formule chimique suivante:



L'aldostérone, sécrétée par la zone glomérulée du cortex surrénalien, est de loin le régulateur le plus puissant de la sécrétion d'électrolytes.

L'aldostérone se lie aux récepteurs protéiques spécifiques des cellules rénales, où elle induit la synthèse de l'ARNm avec la formation d'une nouvelle protéine. Le rôle de cette protéine est discuté; on suppose qu'elle facilite l'entrée du sodium dans les cellules de transport ou qu'elle fournit à ces dernières une plus grande énergie pour le transport actif du sodium. Dans les deux cas cette protéine se manifeste en augmentant le transport de sodium (réabsorption).

Dans le néphron distal, l'action de l'aldostérone se manifeste, au niveau du tubule rénal, par un accroissement de la réabsorption des ions de sodium et de chlore de la lumière tubulaire et par une augmentation de l'élimination des ions de potassium et d'hydrogène dans la lumière tubulaire. La réabsorption des ions de sodium et de chlore tend à augmenter l'osmolalité du liquide extracellulaire. Une augmentation de l'osmolalité extracellulaire stimule la sécrétion d'ADH, qui facilite la rétention rénale d'eau. Les ions de sodium, de chlore et l'eau sont généralement retenus ou sécrétés ensemble: c'est la raison pour laquelle on peut affirmer que l'aldostérone stimule, indirectement, la réabsorption de l'eau au niveau des tubules rénaux.

Le mécanisme réglant la sécrétion d'aldostérone répond aux modifications de l'hydratation corporelle. Le système rénine-angiotensine possède la principale fonction médiatrice dans l'hydratation corporelle. Les situations réduisant le volume de liquide extracellulaire et celles qui résultent de la séquestration du sang veineux tendent à stimuler la production de rénine et donc celle d'angiotensine. Cette dernière agit directement sur le système vasculaire en tant qu'agent de pression et, de plus, stimule la sécrétion d'aldostérone du cortex surrénalien.

La sécrétion d'aldostérone dépend aussi directement des:

1. Variations de la concentration plasmatique ou tissulaire de potassium: l'hypokaliémie diminue la sécrétion d'aldostérone tandis que l'hyperkaliémie la stimule.
2. Sécrétion d'ACTH.
3. Variations de la concentration plasmatique ou tissulaire de sodium: l'épuisement du sodium stimule la sécrétion d'aldostérone tandis que la rétention de sodium la diminue.

On peut doser l'aldostérone présente dans le plasma, dans le sérum ou dans les urines éliminées durant les 24 heures. Si l'on tient compte du catabolisme rapide de l'aldostérone, son dosage dans le plasma est très utile pour évaluer les variations aiguës (rythme circadien, changements de position, stimulations et inhibitions de courte durée). D'un point de vue clinique, il faut cependant souligner que les niveaux d'aldostérone dans le plasma n'illustrent qu'un état présent à un moment donné de la journée. La sécrétion de l'aldostérone plasmatique étant épisodique, elle suit en effet un rythme circadien, on ne peut tirer des conclusions sur la base d'une simple détermination. La détermination de l'aldostérone des urines éliminées durant les 24 heures reflète exactement la situation au niveau de la sécrétion journalière tandis que la détermination de l'aldostérone plasmatique est plus appropriée dans le cas d'études détaillées.

2. PRINCIPE DU DOSAGE

Le principe du dosage repose sur la compétition entre, d'une part, l'aldostérone marquée et, de l'autre, l'aldostérone contenue dans les étalons ou les échantillons vis-à-vis des sites d'anticorps, en nombre limité et fixe. Après l'incubation, la quantité d'aldostérone marquée liée à l'anticorps est inversement proportionnelle à la concentration d'aldostérone non marquée présente dans les étalons ou les échantillons. Le moyen de séparation lié/libre est basé sur l'emploi de tubes revêtus sur les parois desquels l'anticorps est fixé.

3. REACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Tubes revêtus	100
Aldostérone marquée à I^{125}	1 flacon
Etalons aldostérone	6 flacons
Sérum de contrôle	1 flacon
Nombre de dosages	100

STOCKAGE: Conserver la trousse à 2-8°C dès réception. Ne pas congeler. Après l'ouverture, les réactifs de cette trousse restent stables jusqu'à la date de péremption de la trousse, s'ils sont conservés de manière adéquate. La trousse est garantie pour réaliser 2 séries analytiques si les réactifs sont conservés d'après les recommandations du fabricant.

Ne pas utiliser les réactifs ayant dépassé la date de péremption. La date de péremption de la trousse est indiquée sur l'étiquette extérieure et correspond à la date de péremption du traceur. La date de péremption de chaque composant est reportée sur les étiquettes des flacons respectifs.

Agiter doucement les flacons lors de la reconstitution de leur contenu, afin d'éviter la formation de mousse.

Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.

3.1. Tubes revêtus

La surface interne de chaque tube est revêtue d'antisérum de lapin anti-aldostérone.

Au moment de l'emploi, amener les tubes revêtus à température ambiante avant d'ouvrir leur boîte, afin d'éviter tout phénomène de condensation.

Conserver les tubes non utilisés dans la boîte en s'assurant que celle-ci est dûment fermée. Ne pas mélanger des tubes revêtus provenant de lots différents.

3.2. Aldostérone marquée à I^{125} (rouge): réactif prêt à l'emploi

Le flacon contient 52 mL d'aldostérone marquée à I^{125} , du sérum humain exempt de stéroïdes, du tampon phosphaté, des conservateurs et un colorant rouge inerte. La radioactivité maximale est de 85 kBq (2,3 μ Ci) à la date d'étalonnage.

3.3. Etalons aldostérone

Chaque flacon contient des quantités croissantes d'aldostérone, du sérum humain exempt de stéroïdes et des conservateurs. Le volume de l'étalon zéro est de 3 mL. Reconstituer le contenu des étalons 1-5 avec 1 mL d'eau distillée. Les solutions ainsi obtenues contiennent respectivement 50 - 100 - 250 - 500 - 1000 pg/mL (0,138 - 0,277 - 0,692 - 1,385 - 2,770 nmol/L). On peut les conserver à 2-8°C pendant une semaine; les congeler divisées en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses dans le cas d'un stockage prolongé. Une préparation étalon internationale n'étant pas actuellement disponible, les étalons de la trousse sont étalonnés par rapport à une préparation interne de référence (pure à 99% avec HPLC). *Les étalons de la trousse sont commutables avec les échantillons examinés s'ils sont utilisés avec les réactifs et le mode opératoire de ce test diagnostique in vitro, d'après les recommandations du fabricant.*

3.4. Sérum de contrôle: réactif lyophilisé

Le flacon contient de l'aldostérone, du sérum d'origine humaine et des conservateurs. La plage de concentrations pour chaque contrôle est indiquée dans le certificat d'analyse et indique les limites établies par DiaSorin pour les valeurs de contrôle qui peuvent être obtenues dans des séries analytiques fiables.

Reconstituer le contenu du flacon avec 1 mL d'eau distillée. La solution ainsi obtenue se conserve à 2-8°C pendant une semaine; la congeler divisée en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses dans le cas d'un stockage prolongé.

4. PRECAUTIONS D'UTILISATION

Toutes les unités de sérum et de plasma utilisées pour la fabrication des composants de cette trousse ont été analysées et ont été trouvées négatives en Ag HBs, en anticorps anti-VHC et en anticorps anti-HIV-1/2. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux. C'est pourquoi il faudra le manipuler avec précaution.

5. REGLES DE SECURITE

- Ne pas manger, ni boire, ni fumer ou se maquiller pendant le dosage.
- Ne pas pipeter avec la bouche.
- Eviter le contact direct avec le matériel potentiellement infectieux en portant des vêtements de laboratoire, des lunettes de protection et des gants à usage unique. Se laver soigneusement les mains à la fin du dosage.
- Eviter de provoquer des éclaboussures ou des vaporisations. Si cela arrivait, chaque goutte de réactif doit être nettoyée avec une solution d'hypochlorite de sodium à 5% et traitée comme du matériel infectieux.
- Tous les échantillons, tous les réactifs biologiques de la trousse et tout le matériel utilisés pour effectuer l'essai doivent être considérés comme capables de transmettre des agents étiologiques. Toute élimination de déchets se fera conformément aux réglementations en vigueur. Le matériel à usage unique doit être incinéré; les déchets liquides doivent être décontaminés avec de l'hypochlorite de sodium à concentration finale de 5% pendant au moins une demi-heure. Tout matériel réutilisable doit être stérilisé en autoclave par un traitement à l'excès (*overkill*)
- (USP 24, 2000, p. 2143). On considère qu'un temps de stérilisation d'une heure à 121°C est convenable. Nous conseillons toutefois à chaque laboratoire de vérifier l'efficacité du cycle de décontamination en effectuant un contrôle au début et en utilisant de façon régulière les indicateurs biologiques.

6. REGLES DE BASE DE RADIOPROTECTION

Réactifs contenant de l'iode 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 2,17 µCi (81 kBq) d'iode-125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, de laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article de verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles de verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :
La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

ATTENTION : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radio-activité théorique de la trousse.

Déchets radioactifs

Tout utilisateur ou détenteur de radioéléments en sources scellées ou non scellées en est responsable et comptable devant les autorités de Santé Publique et, de ce fait, n'est pas autorisé à s'en dessaisir par d'autres voies que celles définies par les procédures réglementaires. Les modalités d'élimination des déchets radioactifs provenant de sources non scellées sont définies par l'avis aux utilisateurs paru au Journal Officiel du 6 juin 1970. Conformément aux dispositions de cet avis et du décret N° 86-1103 du 2 octobre 1986 relatif à la protection des travailleurs contre les dangers des rayonnements ionisants paru au Journal Officiel du 12 octobre 1986, l'OPRI⁽¹⁾ et les organismes désignés par lui sont seuls habilités à procéder à la prise en charge des déchets radioactifs correspondants.

Les laboratoires de notre filiale en France sont autorisés à céder les trousse conformément aux instructions de l'Arrêté du 3 avril 2002 et dans le respect de la réglementation sur le transport de matériel radioactif.

7. MATERIEL NECESSAIRE, MAIS NON FOURNI

- Eau distillée et déminéralisée.
- Réactifs de laboratoire pour le dosage des urines (HCl, acide borique).
- Bêchers.
- Tubes en verre à usage unique.
- Portoir pour tubes.
- Micropipettes avec embouts à usage unique de 10 µL (justesse ± 3%, fidélité 2%) et 200, 500 µL (justesse ± 2%, fidélité 1%).
- Mélangeur Vortex.
- Incubateur thermostaté ou bain-marie capable de maintenir 37° ± 1°C.
- Système d'aspiration du mélange d'incubation.
- Compteur gamma pour compter l'iode ¹²⁵I (définition de la fenêtre du compteur: 15-80 keV - efficacité du compteur: 70% - temps de comptage: 1 min). Si l'efficacité du compteur est inférieure à 60%, le temps de comptage doit être prolongé à 2 min.

8. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Il est fortement conseillé de standardiser scrupuleusement la préparation du patient et les conditions de prélèvement de l'échantillon.

Echantillons de sérum ou de plasma

On peut employer des anticoagulants comme héparine de lithium et de l'EDTA de potassium (voir §9.1). Pour obtenir le sérum prélever le sang par piqûre intraveineuse, le laisser coaguler et séparer le sérum du caillot dès que possible. Clarifier par filtration ou centrifugation avant le test les échantillons troubles, lipémiques et ceux contenant du matériel en suspension ou des déchets érythrocytaires. Ne pas utiliser des échantillons fortement hémolysés ou lipémiques, ni des échantillons contenant des particules en suspension ou une contamination microbienne évidente. Si le dosage est exécuté dans les 24 heures suivant le prélèvement, les échantillons peuvent être conservés à 2-8°C. Dans le cas contraire, ils doivent être aliquotés et congelés à -20°C ou à des températures plus basses. Si les échantillons ont été congelés, attendre qu'ils soient complètement décongelés et les homogénéiser avant le dosage. Il faut éviter les cycles de congélation/ décongélation répétés.

Si l'on prévoit des niveaux d'aldostérone supérieurs à 1000 pg/mL, diluer avec l'étalon zéro.

⁽¹⁾O.P.R.I. BP 35 - 78110 Le Vésinet.

Echantillons d'urines

Mesurer le volume des urines éliminées durant les 24 heures. Les mélanger soigneusement avant d'en prélever une partie aliquote pour l'analyse. Ajouter de l'acide borique (1 g/100 mL d'urines) et conserver à 2-8°C si le dosage a lieu dans les 24 heures ou congeler en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses s'il est exécuté plus tard.

Hydrolyse des urines

On peut doser l'aldostérone présente dans les échantillons d'urines après hydrolyse acide de l'aldostérone 18-glucuronide. L'hydrolyse est complète si l'on applique la procédure préconisée.

- **Ajouter 1 mL d'HCl 0,1 N à 100 µL d'urines** dans des tubes en verre.
- Obturer les tubes puis **incuber à 30 ± 2°C pendant 18-22 heures**.

9. MODE OPERATOIRE

Amener les réactifs à température ambiante (20-25°C) avant le dosage. Effectuer le dosage au moins en doublets. Les étalons doivent être dosés avec chaque série d'échantillons examinés. Le mode opératoire doit être rigoureusement identique pour les étalons et les échantillons à tester.

Exécuter toutes les phases du dosage dans l'ordre prévu, sans interruption.

Utiliser un embout à usage unique neuf pour distribuer les étalons et les échantillons.

- Distribuer les réactifs *au fond des tubes revêtus*. Procéder d'après le schéma suivant:

réactifs \ tubes	Etalon zéro	Etalons 1-5	Echantillons (sérum)	Echantillons (urines hydrolysées)
Etalon zéro	200 µL	–	–	200 µL
Etalons 1-5	–	200 µL	–	–
Echantillons (sérum)	–	–	200 µL	–
Echantillons (urines hydrolysées)	–	–	–	10 µL*
Traceur	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

* Pour les échantillons d'urines contenant une faible concentration d'aldostérone, on préconise l'utilisation d'un volume d'urines hydrolysées de 20 µL.

- **Agiter** le contenu des tubes au Vortex puis **incuber pendant 18-22 heures à température ambiante**.
- **Aspirer** soigneusement le mélange d'incubation. *Vérifier que le liquide soit éliminé complètement: pour cela il faut s'assurer que l'embout de la pipette d'aspiration touche le fond des tubes revêtus. La présence de gouttes adhérant aux parois des tubes revêtus peut entraîner une mauvaise reproductibilité ou fausser les résultats. Le colorant doit disparaître totalement.*
- **Mesurer la radioactivité** des tubes.

10. CALCUL DES RESULTATS

Calculer la moyenne des coups par minute pour chaque groupe de tubes après avoir soustrait la valeur du bruit de fond. Calculer la moyenne des coups par minute des étalons et des échantillons en pourcentage par rapport à l'étalon zéro:

$$B/Bo\% = \frac{\text{moyenne des coups par minute des étalons ou des échantillons}}{\text{moyenne des coups par minute de l'étalon zéro}} \times 100$$

Reporter sur du papier semilogarithmique ou bi-linéaire le pourcentage moyen calculé pour chaque étalon sur l'axe des ordonnées (y) en fonction de la concentration d'aldostérone exprimée en pg/mL ou en nmol/L sur l'axe des abscisses (x). La Fig. 1 présente un exemple de la courbe d'étalonnage ainsi obtenue.

Echantillons de sérum ou de plasma

Lire directement la concentration d'aldostérone de chaque échantillon exprimée en pg/mL ou en nmol/L de la courbe d'étalonnage. Si l'échantillon a été dilué, la concentration obtenue doit être multipliée par le facteur de dilution.

Echantillons d'urines

On calcule la sécrétion journalière d'aldostérone, exprimée en µg ou en nmol/24 heures, de la façon suivante:

- *Pour un volume de 10 µL d'échantillon d'urines hydrolysées*
Multiplier la valeur lue de la courbe d'étalonnage par 220 afin d'obtenir le niveau d'aldostérone dans les urines (en pg/mL ou en nmol/L). Le coefficient 220 provient du facteur de dilution des urines hydrolysées (11), multiplié par le rapport étalon/échantillon (20).
- *Pour un volume de 20 µL d'échantillon d'urines hydrolysées*
Multiplier la valeur lue de la courbe d'étalonnage par 110 afin d'obtenir le niveau d'aldostérone dans les urines (en pg/mL ou en nmol/L). Le coefficient 110 provient du facteur de dilution des urines hydrolysées (11), multiplié par le rapport étalon/échantillon (10).

Pour obtenir le taux de sécrétion journalière d'aldostérone, multiplier le niveau d'aldostérone par le volume des urines éliminées (exprimé en mL) en utilisant les formules suivantes:

$$\begin{aligned}\mu\text{g}/24 \text{ heures} &= \text{pg/mL} \times \text{mL d'urines éliminées} \times 10^{-6} \\ \text{nmol}/24 \text{ heures} &= \text{nmol/L} \times \text{mL d'urines éliminées} \times 10^{-3}.\end{aligned}$$

Exemple de calcul

Les valeurs suivantes ne constituent qu'un exemple et ne doivent pas être employées à la place des données obtenues par l'utilisateur.

Description	cpm	B/Bo x 100
Etalon zéro	10.220	100
50 pg/mL - 0,138 nmol/L	8.534	83,5
100 pg/mL - 0,277 nmol/L	7.409	72,5
250 pg/mL - 0,692 nmol/L	5.243	51,3
500 pg/mL - 1,385 nmol/L	3.352	32,8
1.000 pg/mL - 2,770 nmol/L	1.942	19,0
Echantillon (sérum)	6.805	66,8
Echantillon (urines)	8.262	81,0

Echantillon de sérum

En effectuant l'interpolation de la courbe d'étalonnage, l'échantillon contient 140 pg/mL (0,388 nmol/L) d'aldostérone.

Echantillon d'urines

En effectuant l'interpolation de la courbe d'étalonnage, l'échantillon contient 70 pg/mL (0,194 nmol/L) d'aldostérone.

En considérant le facteur 220 et le volume total des urines éliminées durant les 24 heures (ex.: 1100 mL), on calcule la sécrétion journalière d'aldostérone comme suit:

$$\begin{aligned}\mu\text{g}/24 \text{ heures} &= 70 \times 220 \times 1100 \times 10^{-6} &= 15400 \times 1100 \times 10^{-6} &= 16,94 \\ \text{nmol}/24 \text{ heures} &= 0,194 \times 220 \times 1100 \times 10^{-3} &= 42,68 \times 1100 \times 10^{-3} &= 46,95\end{aligned}$$

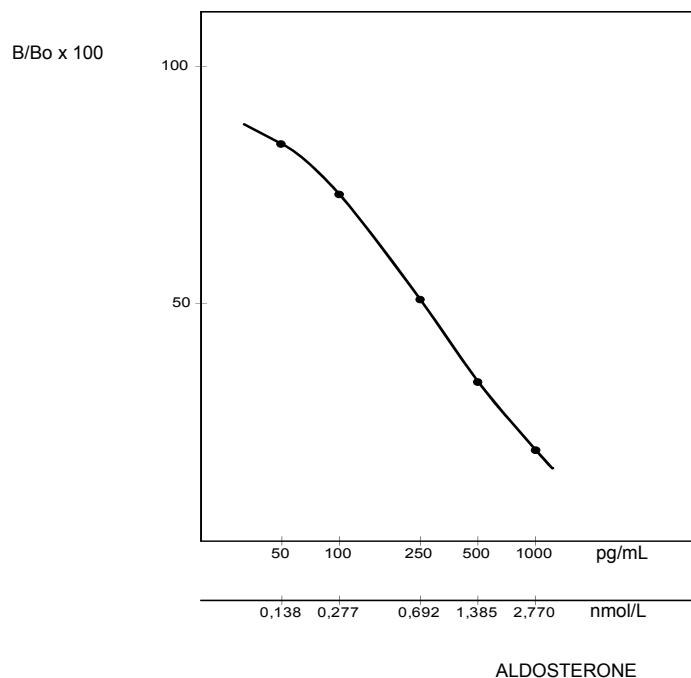


Fig. 1

11. VALEURS DE REFERENCE

Dans une population normale avec un apport sodique de 100-150 mEq/24 heures, on a obtenu les intervalles ci-après. Ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif. Chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles des valeurs de référence.

Sujets normaux	PLASMA, pg/mL	URINES, µg/24 heures
Position sur le dos	7,5 - 150	2,8 - 30,0
Position debout	35 - 300	

Pour la conversion en nmol d'aldostérone/L, utiliser la formule suivante:

$$\text{nmol d'aldostérone/L} = \text{pg d'aldostérone/mL} \times 2,77 \times 10^{-3}$$

12. CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

12.1. Spécificité analytique

La spécificité analytique est définie comme la capacité du test à détecter exactement l'analyte en présence de facteurs pouvant interférer dans la matrice de l'échantillon (par exemple anticoagulants, hémolyse, effets de traitement de l'échantillon) ou d'autres analytes pouvant provoquer des réactions croisées.

Interférences. Des études contrôlées sur des facteurs potentiellement interférents ont démontré que les caractéristiques du test ne sont pas modifiées par une lipémie (jusqu'à 500 mg/dL de triglycérides), une bilirubinémie (jusqu'à 20 mg/dL de bilirubine). Les valeurs d'aldostérone obtenues avec des échantillons contenant 200 mg/dL d'hémoglobine sont supérieures d'environ 10% aux valeurs obtenues avec des échantillons normaux.

Lors d'études sur l'interférence des anticoagulants on a prélevé des échantillons de sérum et de plasma (obtenus sur héparine de lithium et sur EDTA de potassium) sur 41 volontaires sains. Tous les échantillons ont été analysés avec la méthode standard. Les résultats sont les suivants:

Nb	Echantillon	Sérum	Héparine	EDTA
41	moyenne (pg/mL)	181,6 (100%)	183,9 (101,3%)	197,1 (108,5%)

Ces études montrent que les valeurs d'aldostérone obtenues avec les échantillons de plasma sur EDTA de potassium sont supérieures d'environ 10% aux valeurs obtenues avec les échantillons de sérum ou de plasma sur héparine de lithium.

Réactions croisées. Les pourcentages de réactions croisées, calculés selon la méthode d'Abraham, montrent la spécificité de l'antisérum utilisé dans la trousse.

- Aldostérone	100%
- 3 bêta, 5 alpha-tétrahydroaldostérone	4.2%
- 3 alpha, 5 bêta-tétrahydroaldostérone	0.3%
- Cortexolone	$6.4 \times 10^{-3}\%$
- 18-OH-déoxycorticostérone	$5.0 \times 10^{-3}\%$
- Corticostérone	$4.0 \times 10^{-3}\%$
- Cortisone	$2.5 \times 10^{-3}\%$
- Désoxycorticostérone	$1.0 \times 10^{-3}\%$
- Testostérone	$8.0 \times 10^{-4}\%$
- Prednisolone	$6.4 \times 10^{-4}\%$
- Cortisol	$1.0 \times 10^{-4}\%$
- Progestérone	$8.0 \times 10^{-5}\%$
- Spironolactone	$6.5 \times 10^{-5}\%$
- Déhydroépiandrostérone	$6.0 \times 10^{-5}\%$
- Prégnénolone	$5.0 \times 10^{-5}\%$
- Prégnanetriol	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Dexaméthasone	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Oestradiol	$1.0 \times 10^{-6}\%$

12.2. Sensibilité analytique

La sensibilité analytique peut être exprimée aussi comme la limite de détection, c'est-à-dire la quantité d'analyte minimum que le test peut détecter. La limite de détection est de 10 pg/mL (0,0275 nmol/L), avec des limites de confiance à 95%, calculée comme étant la concentration apparente d'analyte qui peut être différenciée de l'étalon zéro, c'est-à-dire deux écarts type au-dessous de zéro.

12.3. Fidélité

Plusieurs pools de référence à différentes concentrations d'analyte ont été testés pour déterminer la répétabilité et la reproductibilité du dosage (c'est-à-dire, la variabilité intra-essai et inter-essais).

Répétabilité	A	B	C
Nombre de déterminations	10	10	10
Moyenne (pg/mL)	86,4	249,9	495,6
Ecart type	4,60	9,50	8,60
% de coefficient de variation	5,3	3,8	1,7

Reproductibilité	A	B	C
Nombre de déterminations	15	15	15
Moyenne (pg/mL)	91,3	230,3	607,5
Ecart type	5,72	7,90	26,40
% de coefficient de variation	7,0	3,4	4,3

12.4. Justesse

La justesse du dosage a été vérifiée à l'aide des tests de dilution et de surcharge.

Test de dilution. Le test de dilution a été réalisé sur deux sérums de concentration élevée en aldostérone dilués en série à l'aide de l'étalon zéro.

Dilution	Concentration attendue, pg/mL	Concentration mesurée, pg/mL	% Récupération
pur	–	706,0	–
1/2	353,0	360,5	102,1
1/4	176,5	167,7	95,0
1/8	88,3	92,7	105,0
1/16	44,1	43,0	97,5
pur	–	355,0	–
1/2	177,5	165,0	93,0
1/4	88,8	92,7	104,5
1/8	44,4	46,0	103,7
1/16	22,2	25,7	115,8

Test de surcharge. Le test de surcharge a été réalisé sur deux sérums contenant de l'aldostérone soit purs soit par ajouts de quantités croissantes d'aldostérone.

Concentration ajoutée, pg/mL	Concentration attendue, pg/mL	Concentration mesurée, pg/mL	% Récupération
–	–	147,0	–
520	659,7	713,0	108,1
300	439,7	469,0	106,7
180	319,7	305,0	95,4
40	179,7	177,0	98,5
–	–	291,0	–
520	796,5	815,0	102,3
300	576,5	573,0	99,4
180	456,5	435,0	95,3
40	316,5	321,0	101,4

13. LIMITES DU DOSAGE

La signification clinique des niveaux d'aldostérone n'est d'aucune valeur si l'apport journalier de sodium et de potassium ou la posture du patient ne sont pas contrôlés ou si l'on administre des médicaments tels que les diurétiques, la clonidine, les agents bêta-bloquants, la réserpine, l'alpha-méthylidopa, etc.

Le diagnostic ne doit pas être établi d'après le résultat d'un seul dosage, mais il faut prendre en considération les investigations cliniques, les autres procédures diagnostiques et l'avis d'un médecin.

La contamination bactérienne des échantillons ou leurs cycles répétés de congélation/ décongélation peuvent modifier les résultats du dosage.

Afin d'obtenir des résultats fiables, il faut suivre strictement le mode opératoire et effectuer les manipulations de façon appropriée. En particulier, la précision et le soin apportés durant les phases de reconstitution et de distribution des réactifs ainsi que d'aspiration sont indispensables à la fiabilité du test.

Des résultats qui ne sont pas reproductibles sont dus principalement à des erreurs de manipulation comme par exemple:

- échange de bouchons entre les flacons
- utilisation du même embout pour prélever dans différents flacons ou distribuer les différents échantillons
- flacons restés trop longtemps ouverts
- exposition des réactifs ou des échantillons à une température élevée ou à de fortes sources de contamination bactérienne
- aspiration inadéquate du mélange d'incubation
- contamination du bord des tubes avec le traceur ou avec les échantillons
- oscillations accidentelles ou mauvais entretien du compteur gamma
- mélange de réactifs provenant de lots différents.

SCHÉMA DU DOSAGE

- 1 - DOSER DIRECTEMENT LES ÉCHANTILLONS DE SÉRUM OU DE PLASMA.
HYDROLYSER LES ÉCHANTILLONS D'URINES AVEC DE L'HCl 0,1 N PENDANT 18-22 HEURES A 30°C.
- 2 - RECONSTITUER LES RÉACTIFS. IDENTIFIER AU MOYEN D'UN REPÈRE LES TUBES REVÊTUS EN DOUBLETS.
- 3 - DISTRIBUER LES RÉACTIFS EN FONCTION DU SCHÉMA SUIVANT PUIS AGITER LE MÉLANGE D'INCUBATION:

TUBES RÉACTIFS	ÉTALON 0	ÉTALONS 1-5	ÉCHANTILLONS (SÉRUM)	ÉCHANTILLONS (URINES HYDROLYSÉES)
ÉTALON ZÉRO	200 µL	-	-	200 µL
ÉTALONS 1-5	-	200 µL	-	-
ÉCHANTILLONS (SÉRUM)	-	-	200 µL	-
ÉCHANTILLONS (URINES HYDROLYSÉES)	-	-	-	10 µL*
TRACEUR	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

- 4 - INCUBER PENDANT 18-22 HEURES A TEMPÉRATURE AMBIANTE.
- 5 - ASPIRER LE MÉLANGE D'INCUBATION.
- 6 - MESURER LA RADIOACTIVITÉ DES TUBES.

* 20 µL pour les échantillons contenant un faible taux d'aldostérone.

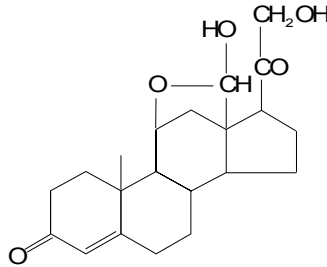
ALDOSTERON RIA

Methode zur quantitativen radioimmunologischen Bestimmung des Aldosterons in Humanserum, -plasma oder -urin

Nur für In-vitro-Diagnostik

1. EINLEITUNG

Aldosteron ist ein Steroidhormon mit einem Molekulargewicht von 360,4 Daltons und der folgenden chemischen Formel:



Aldosteron wird von der Zona glomerulosa (dem glomerulären Bereich) der Nebennierenrinde abgesondert und ist der stärkste Regler der Elektrolyten-Absonderung im Urin.

Aldosteron bindet sich an spezifische Hormonrezeptoren in den entsprechenden Nierenzellen, wo es möglicherweise die mRNA-Synthese induziert, mit darauffolgender Bildung eines neuen Proteins. Die Rolle dieses Proteins ist umstritten, aber man denkt, dass es den Eintritt vom Natrium in die Trägerzellen erleichtert, oder dass es diesen Zellen eine größere Energie für den aktiven Natrium-Transport gibt. In beiden Fällen zeigt sich seine Auswirkung mit einer Erhöhung des Natrium-Transports (Resorption).

In der distalen Nierenzelle zeigt sich die Auswirkung von Aldosteron mit einer Erhöhung der Resorption der Natrium- und Chlor-Ionen vom tubulären Lumen und mit einer Erhöhung der Absonderung von Kalium- und Wasserstoff-Ionen im tubulären Lumen. Die Resorption der Natrium- und Chlor-Ionen neigt dazu, die Osmolalität der extrazellulären Flüssigkeit zu erhöhen. Die Erhöhung der extrazellulären Osmolalität stimuliert die Absonderung von ADH, und ADH erleichtert die Wasserverhaltung von Seiten der Nieren. Natrium-, Chlor-Ionen und Wasser werden im Allgemeinen zusammen verhalten oder abgesondert; daher kann man sagen, dass Aldosteron die Wasserresorption in den Nierenröhrchen indirekt stimuliert.

Der Mechanismus zur Regelung der Aldosteron-Absonderung antwortet auf die Änderungen der Körper-Hydratation. Das Renin-Angiotensin-System ist der wichtigste Vermittler der körperlichen Hydratation. Die Bedingungen, die das Volumen der extrazellulären Flüssigkeit vermindern, und diejenigen, die zur Abnahme des Venenbluts führen, neigen dazu, die Herstellung von Renin, und daher von Angiotensin, zu stimulieren. Angiotensin wirkt direkt auf das Gefäßsystem und erhöht den Blutdruck; es stimuliert außerdem die Aldosteron-Absonderung von der Nebennieren-Rinde.

Die Absonderung von Aldosteron wird auch von den folgenden Bedingungen direkt beeinflusst:

1. Änderungen der Kalium-Konzentration im Plasma oder in den Geweben: Hypokaliämie vermindert, Hyperkaliämie erhöht die Aldosteron-Absonderung.
2. Absonderung von ACTH.
3. Änderungen der Natrium-Konzentration im Plasma oder in den Geweben: Hyponatriämie erhöht, Hypernatriämie vermindert die Aldosteron-Absonderung.

Die Bestimmung von Aldosteron kann im Plasma oder im Serum und im 24-Stunden-Urin durchgeführt werden.

Wenn man sich den schnellen katabolischen Rhythmus von Aldosteron gegenwärtig hält, ist die Bestimmung von Aldosteron im Plasma sehr nützlich bei der Auswertung der akuten Änderungen (zirkadianer Rhythmus, Handlungsänderungen, Anregungen und Inhibitionen mit kurzer Dauer). Aus einem klinischen Gesichtspunkt muss man aber die Tatsache hervorheben, dass die plasmatischen Aldosteron-Werte nur der Bedingung in einem bestimmten Augenblick des Tages entsprechen.

Da die Absonderung vom plasmatischen Aldosteron einen episodischen Verlauf hat, der einem zirkadianen Rhythmus folgt, kann es nicht angemessen sein, dass man von einer einzigen Bestimmung zu einem Schluss kommt. Die Bestimmung von Aldosteron im 24-Stunden-Urin stellt die tägliche Absonderung ganz dar, während die Bestimmung vom plasmatischen Aldosteron für gezielte Forschungen geeigneter ist.

2. TESTPRINZIP

Die Bestimmung basiert auf der Competition zwischen markiertem Aldosteron und Aldosteron in den Kalibratoren oder in den Proben um eine begrenzte Zahl an die Röhrcchenwand gebundener Antikörperbindungsstellen. Nach der Inkubation ist die Menge des wandgebundenen markierten Aldosterons umgekehrt proportional zur Konzentration des freien Aldosterons in den Kalibratoren oder in den Proben. Als Trennmethode werden die beschichteten Röhrcchen verwendet, bei denen die Antikörper an der Röhrccheninnenfläche fixiert sind.

3. LIEFERUMFANG DES TESTS

Beschichtete Röhrcchen	100
¹²⁵ J-markiertes Aldosteron	1 Fläschchen
Aldosteron-Kalibratoren	6 Fläschchen
Kontrollserum	1 Fläschchen
Anzahl der Bestimmungen	100

LAGERUNG: Die Testpackung bei 2-8°C lagern! Nicht einfrieren. Nach dem Öffnen sind alle Reagenzien des Kits bei entsprechender Lagerung bis zum Verfalldatum des Kits stabil. Der Kit wurde für die Durchführung von 2 analytischen Testserien entworfen, wenn die Reagenzien gemäß den Anweisungen des Herstellers aufbewahrt werden.

Die Reagenzien sind nicht nach dem Verfalldatum zu benutzen. Das Verfalldatum des Kits befindet sich auf der Verpackung und ist identisch mit dem Verfalldatum des Tracers. Die Verfalldaten der einzelnen Reagenzien sind jeweils auf den Fläschchenetiketten angegeben.

*Die Reagenzien unter Vermeidung von Schaum auflösen.
Nie unterschiedliche Reagenzienchargen miteinander mischen!*

3.1. Beschichtete Röhrcchen

Die Innenfläche der Röhrcchen ist mit Antiserum gegen Aldosteron (Kaninchen) beschichtet.
*Vor Gebrauch die Röhrcchen in der ungeöffneten Dose auf Raumtemperatur bringen, um die Bildung von Kondenswasser auf der Oberfläche zu vermeiden.
Nichtgebrauchte Röhrcchen in der Dose lagern. Die Dose gut verschließen. Nie verschiedene Chargen beschichteter Röhrcchen miteinander mischen.*

3.2. ¹²⁵J-markiertes Aldosteron (rot) (gebrauchsfertige Lösung)

Das Fläschchen enthält 52 mL mit ¹²⁵J markiertes Aldosteron, steroidloses Humanserum, Phosphatpuffer, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die Radioaktivität beträgt max. 85 kBq (2,3 µCi) am Tag der Kalibration.

3.3. Aldosteron-Kalibratoren

Die Fläschchen enthalten ansteigende Aldosteron-Konzentrationen, steroidloses Humanserum und Konservierungsmittel. Der Inhalt des Nullkalibrators ist 3 mL.

Den Inhalt der Kalibratoren 1-5 mit 1 mL Aqua dest. auflösen. Die so erhaltenen Lösungen haben folgenden Konzentrationen: 50 - 100 - 250 - 500 - 1000 pg/mL (0,138 - 0,277 - 0,692 - 1,385 - 2,770 nmol/L); sie sind eine Woche lang bei 2-8°C haltbar. Zur Verlängerung der Haltbarkeit portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter). Da keine internationale Standard-Präparation gegenwärtig verfügbar ist, sind die Kit-Kalibratoren nach einer Innenreferenzpräparation kalibriert (99% Reinheit bei HPLC). *Die Kalibratoren des Kits sind mit den untersuchten Proben umschaltbar, wenn sie mit den Reagenzien und der Testdurchführung dieses In-vitro diagnostischen Tests verwendet werden, gemäß den Anweisungen des Herstellers.*

3.4. Kontrollserum (lyophilisiert)

Das Fläschchen enthält Aldosteron, Humanserum und Konservierungsmittel. Der Konzentrationsbereich jeder Kontrolle ist auf dem Analysenzertifikat angegeben; er gibt die Grenzen an, die von DiaSorin für Kontrollwerte festgelegt wurden, die in zuverlässigen Testdurchgängen erhalten werden können.

Den Inhalt des Fläschchens mit 1 mL Aqua dest. auflösen. Die so erhaltene Lösung ist eine Woche lang bei 2-8°C haltbar. Zur Verlängerung der Haltbarkeit portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter).

4. ERFORDERLICHE GERÄTE UND MATERIALIEN (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

- Aqua dest. und deionisiertes Wasser.
- Laborreagenzien für die Bestimmung von Urin (HCl, Borsäure).
- Glasbehälter.
- Glasröhrchen für den einmaligen Gebrauch.
- Röhrchen-Ständer.
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 200, 500 μL) (10 μL : Richtigkeit $\pm 3\%$, Präzision 2%; 200, 500 μL : Richtigkeit $\pm 2\%$, Präzision 1%).
- Vortex-Mischer.
- Wasserbad mit Thermostat ($37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$).
- Absaugvorrichtung zum Absaugen der Inkubationsmischung.
- Gammacounter um das ^{125}J -Jod zu zählen (Anlegen der Counter-Öffnung: 15-80 keV - Counter-Leistungsfähigkeit: 70% - Zählungszeit: 1 Min.). Wenn die Counter-Leistungsfähigkeit kleiner als 60% ist, muss die Zählungszeit verlängert werden (2 Min.).

5. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Die Vorschriften zur Vorbereitung der Patienten und der Blutentnahme sollten genauestens eingehalten werden.

Serum oder Plasma-Proben

Die Antikoagulanten Lithium-Heparin und Kalium-EDTA wurden getestet und können in diesem Test benutzt werden (siehe Kap. 9.1). Blut aus der Vene entnehmen, koagulieren lassen und das Serum so schnell wie möglich vom Koagulat trennen. Die Proben, die Teilchen in Suspension aufweisen, trüb oder lipämisch sind, oder Erythrozytenreste aufweisen, durch Filtern oder Zentrifugieren klären. Weder stark hämolytische oder lipämische Proben, noch Proben mit Teilchen in Suspension oder eindeutiger Mikrobenkontamination verwenden! Werden die Bestimmungen innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2-8°C aufbewahrt werden; andernfalls portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter). Sind die Proben aufgetaut worden, vor der Bestimmung vorsichtig schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!

Werden Aldosteron-Werte > 1000 pg/mL erwartet, sind die Proben mit dem Nullkalibrator zu verdünnen.

Urin-Proben

24-Stunden-Urin sammeln und dessen Volumen messen. Sorgfältig mischen, bevor man einen Anteil für den Test entnimmt. Borsäure hinzufügen (1 g/100 mL Urin) und bei 2-8°C aufbewahren, wenn die Bestimmung innerhalb von 24 Stunden durchgeführt wird; für längere Zeiten portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter).

Urin-Hydrolyse

Aldosteron kann in Urin-Proben nach Säurehydrolyse von Aldosteron 18-Glykuronat bestimmt werden. Bei den empfohlenen Bedingungen ist die Hydrolyse komplett.

- In Glasröhrchen **100 μL Urin** und **1 mL 0,1 N HCl** hinzufügen.
- Röhrchen stopfen und **18-22 Stunden bei $30 \pm 2^\circ\text{C}$ inkubieren**.

6. TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen. Mindestens Doppelbestimmungen durchführen. Die Bestimmung der Kalibratoren ist für jede ProbenSerie durchzuführen. Kalibratoren und Proben unter den gleichen Bedingungen testen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerungen zwischen den einzelnen Versuchsschritten durchführen.

Für jede Pipettierung der Kalibratoren und der Proben saubere Einmalspitzen benutzen.

- Reagenzien auf den Boden der beschichteten Röhrchen pipettieren. Der Testverlauf erfolgt nach folgendem Schema:

Reagenzien \ Röhrchen	Nullkalibrator	Kalibratoren 1-5	Proben (Serum)	Proben (hydrolysierter Urin)
Nullkalibrator	200 µL	–	–	200 µL
Kalibratoren 1-5	–	200 µL	–	–
Proben (Serum)	–	–	200 µL	–
Proben (hydrolysierter Urin)	–	–	–	10 µL*
Tracer	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

* Bei Urin-Proben mit niedrigem Aldosteron-Niveau empfiehlt man, dass man 20 µL hydrolysierten Urin verwendet.

- Mit dem Vortex-Mischer vorsichtig den Inhalt der Röhrchen **schütteln** und **18-22 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren**.
- Vorsichtig die Inkubationsmischung **absaugen**. Es ist zu überprüfen, ob die Flüssigkeit vollständig eliminiert ist, indem man sich versichert, dass die Absaug-Pipettenspitze den Boden der beschichteten Röhrchen berührt. Das Vorhandensein von Tröpfchen, die an die Wände der beschichteten Röhrchen heften, kann schwer reproduzierbare oder ungläubhafte Ergebnisse verursachen. Kein Farbstoff soll sichtbar sein.
- Die **Radioaktivität** der Röhrchen **messen**.

7. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die mittlere Nettozählrate von Proben und Kalibratoren ausrechnen. Den B/Bo%-Quotienten nach folgender Formel ausrechnen:

$$B/Bo\% = \frac{\text{Mittlere Zählrate von Proben oder Kalibratoren}}{\text{Mittlere Zählrate des Nullkalibrators}} \times 100$$

Auf linear-linearem oder halblogarithmischem Papier die mittlere Prozentwerte jedes Kalibrators auf der Ordinate (y-Achse) in Funktion zur Aldosteron-Konzentration ausgedrückt in pg/mL oder nmol/L auf der Abszisse (x-Achse) auftragen. Durch Verbinden der Punkte wird eine Kalibrationskurve erstellt (Abb. 1).

Serum- oder Plasma-Proben

Die Aldosteron-Konzentration jeder Probe, ausgedrückt in pg/mL oder nmol/L, direkt von der Kalibrationskurve ablesen. Werte verdünnter Proben müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Urin-Proben

Die Berechnung der täglichen Aldosteron-Absonderung, in µg oder nmol/24 Stunden ausgedrückt, erfolgt durch das folgende Verfahren.

- Für eine hydrolysierte Urin-Probe mit einem 10 µL-Volumen
Den von der Kalibrationskurve abgelesenen Wert mit 220 multiplizieren, um die Aldosteron-Konzentration im Urin, in pg/mL oder in nmol/L ausgedrückt, zu erhalten. Der Koeffizient 220 stammt vom Verdünnungsfaktor des hydrolysierten Urins (11) multipliziert mit dem Verhältnis Kalibrator/Probe (20).
- Für eine hydrolysierte Urin-Probe mit einem 20 µL-Volumen
Den von der Kalibrationskurve abgelesenen Wert mit 110 multiplizieren, um die Aldosteron-Konzentration im Urin, in pg/mL oder in nmol/L ausgedrückt, zu erhalten. Der Koeffizient 110 stammt vom Verdünnungsfaktor des hydrolysierten Urins (11) multipliziert mit dem Verhältnis Kalibrator/Probe (10).

Um die Konzentration der täglichen Aldosteron-Absonderung zu erhalten, die Aldosteron-Konzentration mit dem Volumen des abgesonderten Urins (in mL ausgedrückt) gemäß den folgenden Formeln multiplizieren:

$$\begin{aligned} \mu\text{g}/24 \text{ Stunden} &= \text{pg/mL} \times \text{mL abgesonderter Urin} \times 10^{-6} \\ \text{nmol}/24 \text{ Stunden} &= \text{nmol/L} \times \text{mL abgesonderter Urin} \times 10^{-3} \end{aligned}$$

Berechnungsbeispiel

Nachfolgende Daten gelten lediglich als Beispiel und dürfen nicht zur Ermittlung der tatsächlichen Ergebnisse benutzt werden.

Bezeichnung	cpm	B/Bo x 100
Nullkalibrator	10.220	100
50 pg/mL - 0,138 nmol/L	8.534	83,5
100 pg/mL - 0,277 nmol/L	7.409	72,5
250 pg/mL - 0,692 nmol/L	5.243	51,3
500 pg/mL - 1,385 nmol/L	3.352	32,8
1.000 pg/mL - 2,770 nmol/L	1.942	19,0
Probe (Serum)	6.805	66,8
Probe (Urin)	8.262	81,0

Serum-Probe

Durch Ablesen von der Kalibrationskurve wird für die Probe einen Aldosteron-Wert von 140 pg/mL (0,388 nmol/L) gefunden.

Urin-Probe

Durch Ablesen von der Kalibrationskurve wird für die Probe einen Aldosteron-Wert von 70 pg/mL (0,194 nmol/L) gefunden.

Indem man sich den Faktor 220 und das Gesamtvolumen des gesammelten 24-Stunden-Urins (z.B. 1100 mL) gegenwärtig hält, wird die tägliche Aldosteron-Absonderung wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} \mu\text{g}/24 \text{ Stunden} &= 70 \times 220 \times 1100 \times 10^{-6} = 15400 \times 1100 \times 10^{-6} = 16,94 \\ \text{nmol}/24 \text{ Stunden} &= 0,194 \times 220 \times 1100 \times 10^{-3} = 42,68 \times 1100 \times 10^{-3} = 46,95. \end{aligned}$$

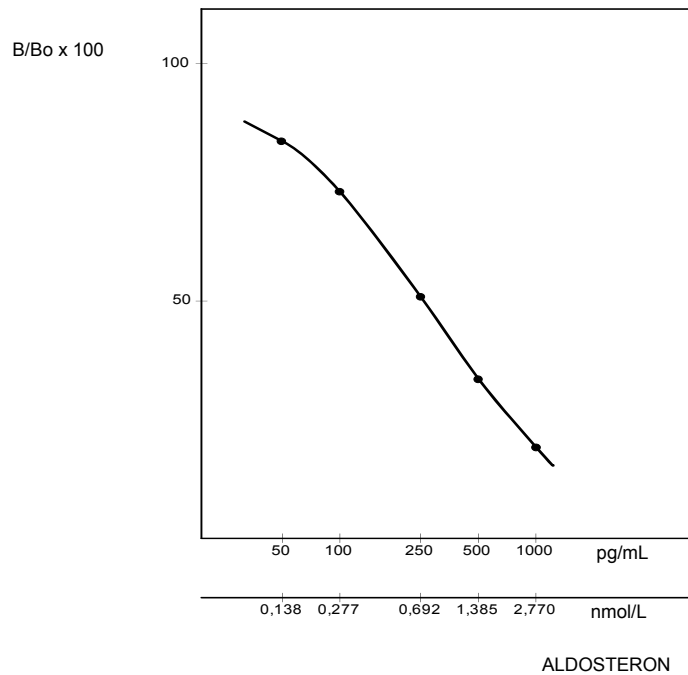


Abb. 1

8. ERWARTETE WERTE

Durch Untersuchung einer Bevölkerung normaler Personen mit einer Natrium-Aufnahme von 100-150 mEq/24 Stunden wurden die folgenden Intervalle erhalten. Jedes Labor sollte eigene Referenzbereiche ermitteln.

Normale Personen	PLASMA, pg/mL	URIN, µg/24 Stunden
Auf dem Rücken liegend	7,5 - 150	2,8 - 30,0
Aufrecht stehend	35 - 300	

Die Konversion in nmol Aldosteron/L wird mit der folgenden Formel durchgeführt:

$$\text{nmol Aldosteron/L} = \text{pg Aldosteron/mL} \times 2,77 \times 10^{-3}$$

9. TESTMERKMALE

9.1. Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität wird definiert als die Kapazität des Tests, den Analyten genau zu bestimmen bei Vorhandensein von potentiellen Interferenz-Faktoren in der Proben- Matrix (z.B. Antikoagulanten, Hämolyse, Effekte der Proben-Behandlung) oder Kreuzreaktionen mit potentiell interferierenden Analyten.

Interferenzen. Kontrollstudien über potentiell interferierende Faktoren haben gezeigt, dass die Leistungen des Tests nicht durch Lipämie (bis 500 mg/dL Triglyzeride), Bilirubinämie (bis 20 mg/dL Bilirubin). Aldosteron-Werte, die in Proben, die 200 mg/dL Hämoglobin enthalten, erzielt wurden, sind etwa 10% höher als Aldosteron-Werte, die mit normalen Proben erzielt wurden.

Während der Interferenzstudien der Antikoagulanten wurden von 41 gesunden Freiwilligen Serum- und Plasma-Proben (mit Lithium-Heparin und Kalium-EDTA erhalten) entnommen. Alle Proben wurden mit der Standard-Methode mit den folgenden Ergebnissen analysiert:

Nr.	Probe	Serum	Heparin	EDTA
41	mittlerer Wert (pg/mL)	181,6 (100%)	183,9 (101,3%)	197,1 (108,5%)

Die Ergebnisse dieser Tests zeigen, dass die mit Kalium-EDTA gewonnenen Plasma-Proben erhaltenen Aldosteron-Werte ungefähr um 10% höher waren, als die Werte, die mit Serum-Proben oder mit Lithium-Heparin gewonnenen Plasma-Proben erhalten wurden.

Kreuzreaktionen. Die nach Abraham berechneten Kreuzreaktionen-Prozentsätze zeigen die Spezifität des verwendeten Antiserums.

- Aldosteron	100%
- 3 Beta, 5 Alpha-Tetrahydroaldosteron	4.2%
- 3 Alpha, 5 Beta-Tetrahydroaldosteron	0.3%
- Kortexolon	$6.4 \times 10^{-3}\%$
- 18-OH-Desoxycorticosteron	$5.0 \times 10^{-3}\%$
- Corticosteron	$4.0 \times 10^{-3}\%$
- Cortison	$2.5 \times 10^{-3}\%$
- Desoxycorticosteron	$1.0 \times 10^{-3}\%$
- Testosteron	$8.0 \times 10^{-4}\%$
- Prednisolon	$6.4 \times 10^{-4}\%$
- Cortisol	$1.0 \times 10^{-4}\%$
- Progesteron	$8.0 \times 10^{-5}\%$
- Spironolacton	$6.5 \times 10^{-5}\%$
- Dihydroepiandrosteron	$6.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnenolon	$5.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnantriol	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Dexamethason	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Östradiol	$1.0 \times 10^{-6}\%$

9.2. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität kann auch als Nachweisgrenze ausgedrückt werden, d.h. die minimale Quantität des Analyten, die durch den Test bestimmt werden kann. Die Nachweisgrenze ist 10 pg/mL (0,0275 nmol/L) bei einer Konfidenz-Grenze von 95%. Sie wurde als die scheinbare Analyt-Konzentration berechnet, die man vom Nullkalibrator unterscheiden kann, d.h. zwei Standardabweichungen unter dem Nullkalibrator.

9.3. Präzision

Zur Ermittlung der Wiederholpräzision und der Vergleichpräzision des Tests (d.h. Intra- und Inter-Assay) wurden verschiedene Probenpools unterschiedlicher Analyt-Konzentrationen untersucht.

Wiederholpräzision	A	B	C
Anzahl der Bestimmungen	10	10	10
Mittelwert (pg/mL)	86,4	249,9	495,6
Standardabweichung	4,60	9,50	8,60
Variationskoeffizient (%)	5,3	3,8	1,7

Vergleichpräzision	A	B	C
Anzahl der Bestimmungen	15	15	15
Mittelwert (pg/mL)	91,3	230,3	607,5
Standardabweichung	5,72	7,90	26,40
Variationskoeffizient (%)	7,0	3,4	4,3

9.4. Richtigkeit

Die Richtigkeit der Bestimmung wurde mit Verdünnungs- und Wiederfindungstests geprüft.

Verdünnungstest. Es wurden zwei Proben mit hohen Aldosteron-Konzentrationen nach serieller Verdünnung mit dem Nullkalibrator getestet.

Verdünnung	Erwartete Konzentration, pg/mL	Erhaltene Konzentration, pg/mL	% Wiederfindung
leer	–	706,0	–
1:2	353,0	360,5	102,1
1:4	176,5	167,7	95,0
1:8	88,3	92,7	105,0
1:16	44,1	43,0	97,5
leer	–	355,0	–
1:2	177,5	165,0	93,0
1:4	88,8	92,7	104,5
1:8	44,4	46,0	103,7
1:16	22,2	25,7	115,8

Wiederfindungstest. Zwei Proben, die Aldosteron enthalten, wurden als solche und nach Zugabe bekannter Mengen an Aldosteron getestet.

Zugegebene Konzentration, pg/mL	Erwartete Konzentration, pg/mL	Erhaltene Konzentration, pg/mL	% Wiederfindung
–	–	147,0	–
520	659,7	713,0	108,1
300	439,7	469,0	106,7
180	319,7	305,0	95,4
40	179,7	177,0	98,5
–	–	291,0	–
520	796,5	815,0	102,3
300	576,5	573,0	99,4
180	456,5	435,0	95,3
40	316,5	321,0	101,4

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

Der Aldosteron-Test ist nur diagnostisch wertvoll, wenn er unter Kontrolle der Natrium- und Kaliumzufuhr und Berücksichtigung der Körperstellung bei der Probengewinnung durchgeführt wird. Die Aldosteronsekretion beeinflussende Medikamente und Diuretika, Clonidin, Betarezeptorenblocker, Reserpin, Alfamethyldopa, usw. beeinträchtigen den Aussagewert des Tests.

Die Diagnose darf jedoch nicht auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden, sondern muss zusammen mit anderen klinischen Untersuchungen, Diagnoseverfahren und nach dem Urteil des Arztes erfolgen.

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholte Tiefgefrieren- und Auftauen-Zyklen können die Ergebnisse der Bestimmung ändern.

Die einwandfreie Beherrschung der Arbeitstechnik und die strikte Einhaltung der Arbeitsanleitung sind Voraussetzung für die Erzielung zuverlässiger Ergebnisse. Auf präzise Herstellung und Verteilung der Reagenzien und gutes Pipettieren und gründliches Absaugen ist zu achten.

Nicht wiederholbare Proben können folgende Ursachen haben:

- Vertauschen der Fläschchenverschlüsse.
- Verwendung derselben Pipettenspitze beim Pipettieren aus verschiedenen Reagenzfläschchen oder beim Pipettieren unterschiedlicher Proben.
- Aufbewahren der Reagenzien oder Proben bei hohen Temperaturen ($> 25^{\circ}\text{C}$) und bakterielle Kontamination.
- Bakterielle Kontamination durch zu langes Offenlassen der Fläschchen.
- Unzureichendes Absaugen der Röhrchen.
- Kontamination der Röhrchenränder durch Tracer oder Proben.
- Schlechte Detektorstandardisierung und fehlerhafte Bedienung des Counters.
- Verwendung von Reagenzien aus verschiedenen Chargen.

11. WARNUNGEN

Alle für die Herstellung der Kit-Komponenten benutzten Serum- und Plasmaproben wurden analysiert und als nichtreaktiv für HBsAg, Anti-HCV und Anti-HIV-1/2 befunden. Da jedoch kein Prüfverfahren Keimfreiheit wirklich garantieren kann, sollten alle Präparate menschlicher Herkunft als potentiell infektiös angesehen und dementsprechend vorsichtig behandelt werden.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Essen, Trinken, Rauchen und Schminken sind im Labor verboten.
- Lösungen dürfen nicht mit dem Mund pipettiert werden.
- Der direkte Kontakt mit potentiell infiziertem Material ist durch das Tragen von Laborkitteln, Schutzbrille und Einweghandschuhen zu vermeiden. Nach Beendigung des Tests sollten die Hände gründlich gewaschen werden.
- Verspritzen oder Bildung von Aerosol sind zu vermeiden. Verschüttete Reagenzien sollten mit 5%iger Natriumhypochlorit-Lösung entfernt werden. Dabei ist zu beachten, dass es sich hierbei um potentiell infektiöses Material handeln kann.
- Alle Proben, biologischen Reagenzien und für die Testdurchführung verwendeten Materialien müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Die Beseitigung des Abfalls ist nach den Vorschriften der zuständigen Aufsichtsbehörde sowie nach den Anweisungen des verantwortlichen Amtes durchzuführen. Abfall sollte verbrannt werden. Flüssigkeiten müssen mit Natriumhypochlorit dekontaminiert werden. Dabei sollte das Natriumhypochlorit in einer Konzentration von 5% im Endgemisch vorliegen und mindestens 30 Minuten auf die zu beseitigenden Materialien einwirken. Alle Materialien, die wieder verwendet werden sollen, müssen mit einer übertriebenen (*overkill*) Methode (USP 24, 2000, S. 2143) autoklaviert werden. Im Allgemeinen wird eine Stunde bei 121°C als angebrachte Sterilisationszeit angesehen, dennoch wird jedem Benutzer empfohlen, die Wirksamkeit des Dekontaminationszyklus anfangs zu überprüfen und routinemäßig biologische Indikatoren einzusetzen.

13. GRUNDREGELN DES STRAHLENSCHUTZES

Reagenzien mit Jod-125

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit höchstens $2,17 \mu\text{Ci}$ (81 kBq) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Labors oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und den Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung wischen. Alle benutzten Glasbehälter gründlichst mit Wasser spülen, bevor sie zusammen mit anderen Laborbehältern aus Glas ausgewaschen werden.

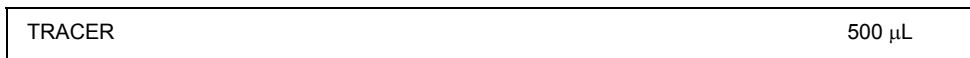
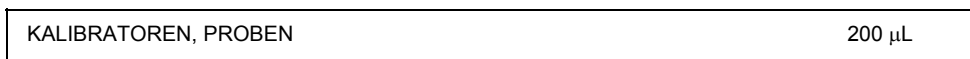
Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten, gilt Folgendes: Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unter-liegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

WICHTIGER HINWEIS: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität des Kits angibt.

ALDOCTK-2
PIPETTIERSCHEMA

BITTE SORGFÄLTIG DIE GEBRAUCHSANLEITUNG BEACHTEN.

100 µL URIN + 1 mL 0,1 N HCl - INKUBATION: 18-22 Std. BEI 30°C.



INKUBATION: 18-22 Std. BEI RAUMTEMPERATUR.



ABSAUGEN.



RADIOAKTIVITÄT DER RÖHRCHEN MESSEN.

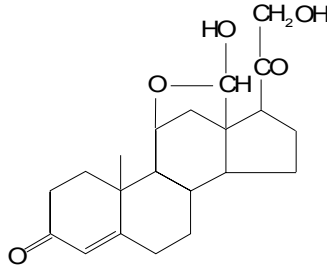
KIT PARA LA DETERMINACIÓN RADIOINMUNOLÓGICA DE LA ALDOSTERONA

Procedimiento para el análisis cuantitativo de la aldosterona en muestras de suero, plasma u orina humana

Sólo para uso in vitro

1. INTRODUCCIÓN

La aldosterona es una hormona esteroide con un peso molecular de 360,4 daltons y con la siguiente fórmula química:



La aldosterona es producida por la zona glomerular de la corteza suprarrenal. Es, con mucho, el regulador más potente de la excreción de electrólitos en las orinas.

La aldosterona se enlaza a receptores hormonales específicos en las relativas células renales en donde probablemente induce la síntesis de RNA mensajero con la consiguiente formación de nueva proteína. El papel de esta proteína es controvertido, pero se cree que facilita la entrada del sodio en las células vectoras o bien que proporciona a dichas células una mayor energía para el transporte activo de sodio. En ambos casos su efecto se manifiesta con un aumento del transporte de sodio (reabsorción).

En el túbulo distal renal, la acción de la aldosterona se manifiesta con un aumento de la reabsorción de iones sodio y cloro del lumen tubular y con un aumento de la eliminación de iones potasio e hidrógeno en el lumen tubular. La reabsorción de iones sodio y cloro tiende a aumentar la osmolaridad del líquido extracelular. El aumento de la osmolaridad extracelular estimula la secreción de ADH y el ADH a su vez facilita la retención de agua por parte del riñón. Iones sodio, cloro y agua generalmente se retienen o excretan juntos: por tanto se puede decir que la aldosterona estimula, indirectamente, la reabsorción de agua a nivel de los túbulos renales.

El mecanismo que regula la secreción de aldosterona responde a las modificaciones de la hidratación corpórea. El sistema renina-angiotensina es el principal mediador de la hidratación corpórea. Las situaciones que reducen el volumen de líquido extracelular y las que resultan en el secuestro de la sangre venosa tienden a estimular la producción de renina y por lo tanto la de angiotensina. La angiotensina actúa directamente en el sistema vascular como agente vasopresor y además estimula la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal.

La secreción de aldosterona está influenciada directamente también por:

1. Variaciones de la concentración plasmática o tisular de potasio: la hipopotasemia deprime, mientras que la hiperpotasemia estimula la secreción de aldosterona.
2. Secreción de ACTH.
3. Variaciones de la concentración plasmática o tisular de sodio: la hiposodiemia estimula, mientras que la hipersodiemia deprime la secreción de aldosterona.

El ensayo de la aldosterona se puede realizar en el plasma o suero y en las orinas de las 24 horas. Teniendo en cuenta el rápido ritmo catabólico de la aldosterona, su determinación en el plasma es muy útil para evaluar las variaciones agudas (ritmo circadiano, cambios de posición, estimulaciones e inhibiciones de breve duración). Desde un punto de vista clínico hay que destacar que los valores plasmáticos de aldosterona reflejan sólo la condición en un determinado momento del día. Dado que la secreción de la aldosterona plasmática tiene una evolución ocasional que sigue un ritmo circadiano, puede no ser válido sacar conclusiones sólo con una determinación. La determinación de la aldosterona en las orinas de las 24 horas refleja completamente la situación secretoria diaria, mientras que la determinación de la aldosterona plasmática es más adecuada para estudios específicos.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El principio del ensayo consiste en la competición entre aldosterona marcada y aldosterona contenida en los calibradores o en las muestras para el número fijo y limitado de sitios anticorpales. Después de la incubación, la cantidad de aldosterona marcada enlazada al anticuerpo fijado en los tubos recubiertos es inversamente proporcional a la concentración de aldosterona no marcada presente en los calibradores o en las muestras. El método adoptado para la separación libre/enlazado está basado en el empleo de los tubos recubiertos, en donde el anticuerpo está fijado a las paredes de los tubos.

3. REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT

Tubos recubiertos	100
Aldosterona marcada con ^{125}I	1 vial
Calibradores de aldosterona	6 viales
Suero de control	1 vial
Número de ensayos	100

MODO DE CONSERVACIÓN: A su llegada conserve el kit a 2-8°C. No congele. Después de la apertura, los reactivos de este kit son estables hasta la fecha de caducidad del kit si se conservan de manera adecuada. El kit está garantizado para 2 sesiones analíticas si los reactivos se conservan según las recomendaciones del fabricante.

No use los reactivos pasada la fecha de caducidad. La fecha de caducidad del kit está escrita en la etiqueta exterior y corresponde a la fecha de caducidad del trazador. La fecha de caducidad de cada componente está indicada en las etiquetas de los respectivos viales.

Al reconstituir el contenido de los viales, agite delicadamente para evitar la formación de espuma.

No mezcle los reactivos provenientes de lotes diferentes.

3.1. Tubos recubiertos

La superficie interior de cada tubo está recubierta con antisuero de conejo anti-aldosterona.

En el momento del uso, ponga los tubos recubiertos a temperatura ambiente antes de abrir el contenedor, para evitar condensaciones de humedad.

Los tubos no utilizados pueden ser conservados controlando que el contenedor esté bien cerrado. No mezcle lotes diferentes de tubos recubiertos.

3.2. Aldosterona marcada con ^{125}I (rojo): reactivo listo para el uso

El vial contiene 52 mL de aldosterona marcada con ^{125}I , suero humano sin esteroides, tampón fosfato, conservantes y un colorante rojo inactivo. La radioactividad máxima es de 85 kBq (2,3 μCi) en la fecha de calibración.

3.3. Calibradores de aldosterona

Cada vial contiene cantidades crecientes de aldosterona, suero humano sin esteroides y conservantes. El volumen del calibrador cero es 3 mL.

Reconstituya el contenido de los calibradores 1-5 con 1 mL de agua destilada. Las soluciones que resultan contendrán respectivamente: 50 - 100 - 250 - 500 - 1000 pg/mL (0,138 - 0,277 - 0,692 - 1,385 - 2,770 nmol/L) y son estables durante una semana a 2-8°C. Congele el reactivo a -20°C o a temperaturas inferiores subdividido en alícuotas en caso de conservación prolongada.

Los calibradores del kit están calibrados contra una preparación interior de referencia (pura al 99% en HPLC), porque actualmente no hay un estándar internacional disponible. *Los calibradores del kit son conmutables con las muestras en examen cuando se utilizan con los reactivos y con el procedimiento operativo de este test diagnóstico in vitro, según las recomendaciones del fabricante.*

3.4. Suero de control: reactivo liofilizado

El vial contiene aldosterona, suero humano y conservantes. El rango de concentraciones de cada control aparece en el certificado de análisis, e indica los límites definidos por DiaSorin para los valores de control que se pueden obtener a partir de ensayos fiables.

Reconstituya el contenido del vial con 1 mL de agua destilada. La solución que resulta es estable durante una semana a 2-8°C. Congele el reactivo a -20°C o a temperaturas inferiores subdividido en alícuotas en caso de conservación prolongada.

4. MATERIALES E INSTRUMENTOS REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada y desionizada.
- Reactivos de laboratorio para el ensayo de orina (HCl, ácido bórico).
- Útiles de laboratorio de vidrio.
- Tubos de vidrio desechables.
- Gradillas para tubos.
- Micropipetas con puntas desechables de 10 µL (veracidad ± 3%, precisión 2%) y 200, 500 µL (veracidad ± 2%, precisión 1%).
- Agitador Vórtex.
- Baño termostático para mantener 37° ± 1°C.
- Sistema para aspirar la mezcla de incubación.
- Contador gamma para contar el yodo ¹²⁵I (establecimiento de la ventana del contador: 15-80 keV - eficiencia del contador: 70% - tiempo de cómputo: 1 min). Si la eficiencia del contador es inferior al 60%, el tiempo de cómputo debe ser prolongado a 2 min.

5. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se recomienda estandarizar cuidadosamente la preparación del paciente y las condiciones de recogida de la muestra.

Muestras de suero o plasma

Se pueden utilizar anticoagulantes como la heparina de litio y el EDTA de potasio (véase §9.1). Recoja la sangre mediante punción venosa, déjela coagular y separe el suero del coágulo lo antes posible. Clarifique por filtración o centrifugación antes del ensayo las muestras que presenten material en suspensión, opalescencia, lipemia o residuos eritrocitarios. No use muestras fuertemente hemolizadas o lipémicas, ni muestras que presenten material suspendido o evidente contaminación microbiana. Si el ensayo se lleva a cabo dentro de las 24 horas sucesivas a la recogida, las muestras se pueden conservar a 2-8°C. En caso contrario, se deben subdividir en alícuotas congeladas a -20°C o a temperaturas inferiores. Si las muestras han sido descongeladas, agítelas con cuidado antes de realizar el ensayo. Evite repetidas congelaciones y descongelaciones.

Si se prevén niveles de aldosterona superiores a 1000 pg/mL, diluya con el calibrador cero.

Muestras de orina

Recoja las orinas de las 24 horas y mida el volumen. Mezcle cuidadosamente antes de recoger una alícuota para el análisis. Añada ácido bórico (1 g/100 mL de orina) y conserve las muestras a 2-8°C si el ensayo se realiza en las 24 horas siguientes. Congele las muestras a -20°C o a temperaturas inferiores subdivididas en alícuotas en caso de conservación prolongada.

Hidrólisis de la orina

La aldosterona se puede ensayar en las muestras de orina después de hidrólisis ácida de la aldosterona 18-glucuronato. En las condiciones recomendadas la hidrólisis es completa.

- **Añada** en tubos de vidrio **100 µL de orina** y **1 mL de HCl 0,1 N**.
- Tape los tubos e **incube durante 18-22 horas a 30 ± 2°C**.

6. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

Ponga los reactivos a temperatura ambiente (20-25°C) antes del ensayo. Prevea determinaciones por duplicado como mínimo. Se debe realizar la determinación de los calibradores para cada serie de muestras analizadas. El procedimiento operativo debe ser exactamente idéntico para los calibradores y para las muestras en examen. Realice todas las fases del ensayo en el orden previsto, sin interrupción.

Utilice puntas desechables nuevas para dispensar calibradores y muestras.

- Distribuya los reactivos *en el fondo de los tubos recubiertos*. Actúe según el siguiente esquema:

reactivos \ tubos	Calibrador cero	Calibradores 1-5	Muestras (suero)	Muestras (orina hidrolizada)
Calibrador cero	200 µL	–	–	200 µL
Calibradores 1-5	–	200 µL	–	–
Muestras (suero)	–	–	200 µL	–
Muestras (orina hidrolizada)	–	–	–	10 µL*
Trazador	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

* *Para las muestras de orina con un bajo nivel de aldosterona, se sugiere emplear un volumen de orina hidrolizada de 20 µL.*

- **Agite** en el Vórtex el contenido de los tubos e **incube durante 18-22 horas a temperatura ambiente**.
- **Aspire** cuidadosamente la mezcla de incubación. *Verifique que el líquido sea eliminado completamente, controlando que la punta de la pipeta de aspiración toque el fondo de los tubos recubiertos. La presencia de gotas adherentes a las paredes de los tubos recubiertos puede provocar baja reproducibilidad o resultados no fiables. No debe quedar traza del colorante.*
- **Mida la radioactividad** de los tubos.

7. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcule la media de los cómputos para cada grupo de tubos después de haber abstraído el valor del fondo. Exprese la media de los cómputos de los calibradores y las muestras como porcentaje respecto al calibrador cero:

$$B/B_0\% = \frac{\text{cómputo medio calibradores o muestras}}{\text{cómputo medio calibrador cero}} \times 100$$

Indique en un gráfico semilog o lineal-lineal el porcentaje medio calculado para cada calibrador en la ordenada (eje de las y) en función de la concentración de aldosterona expresada en pg/mL o nmol/L en la abscisa (eje de las x). De esta manera se obtiene una curva de calibración (Fig. 1).

Muestras de suero o plasma

Lea directamente de la curva de calibración la concentración de aldosterona de cada muestra expresada en pg/mL o nmol/L. Si la muestra ha sido diluida, la concentración de aldosterona encontrada debe ser multiplicada por el factor de dilución.

Muestras de orina

El cálculo de la excreción diaria de aldosterona expresada en µg o nmol/24 horas se realiza siguiendo este procedimiento.

- *Para una muestra de orina hidrolizada de 10 µL de volumen*
Multiplique el valor leído de la curva de calibración por 220, para obtener así la concentración de aldosterona en la orina expresada en pg/mL o en nmol/L. El coeficiente 220 deriva del factor de dilución de la orina hidrolizada (11), multiplicado por la relación calibrador/muestra (20).

- Para una muestra de orina hidrolizada de 20 μL de volumen

Multiplique el valor leído de la curva de calibración por 110, para obtener así la concentración de aldosterona en la orina expresada en pg/mL o en nmol/L . El coeficiente 110 deriva del factor de dilución de la orina hidrolizada (11), multiplicado por la relación calibrador/muestra (10).

Para obtener la concentración de la excreción diaria de aldosterona, multiplique la concentración de aldosterona por el volumen de orina excretada (expresado en mL) según las siguientes fórmulas:

$$\begin{aligned} \mu\text{g}/24 \text{ horas} &= \text{pg/mL} \times \text{mL de orina excretada} \times 10^{-6} \\ \text{nmol}/24 \text{ horas} &= \text{nmol/L} \times \text{mL de orina excretada} \times 10^{-3} \end{aligned}$$

Ejemplo de cálculo

Los siguientes datos deben ser considerados sólo un ejemplo y no deben usarse en lugar de los datos obtenidos por el utilizador.

Descripción	cpm	B/Bo x 100
Calibrador cero	10.220	100
50 pg/mL - 0,138 nmol/L	8.534	83,5
100 pg/mL - 0,277 nmol/L	7.409	72,5
250 pg/mL - 0,692 nmol/L	5.243	51,3
500 pg/mL - 1,385 nmol/L	3.352	32,8
1.000 pg/mL - 2,770 nmol/L	1.942	19,0
Muestra (suero)	6.805	66,8
Muestra (orina)	8.262	81,0

Muestra de suero

Interpolando de la curva de calibración, la muestra contiene 140 pg/mL (0,388 nmol/L) de aldosterona.

Muestra de orina

Interpolando de la curva de calibración, la muestra contiene 70 pg/mL (0,194 nmol/L) de aldosterona.

Teniendo en cuenta el factor 220 y el volumen total de orina recogido en las 24 horas (por ej. 1100 mL), la excreción diaria de aldosterona se calcula del siguiente modo:

$$\begin{aligned} \mu\text{g}/24 \text{ horas} &= 70 \times 220 \times 1100 \times 10^{-6} = 15400 \times 1100 \times 10^{-6} = 16,94 \\ \text{nmol}/24 \text{ horas} &= 0,194 \times 220 \times 1100 \times 10^{-3} = 42,68 \times 1100 \times 10^{-3} = 46,95 \end{aligned}$$

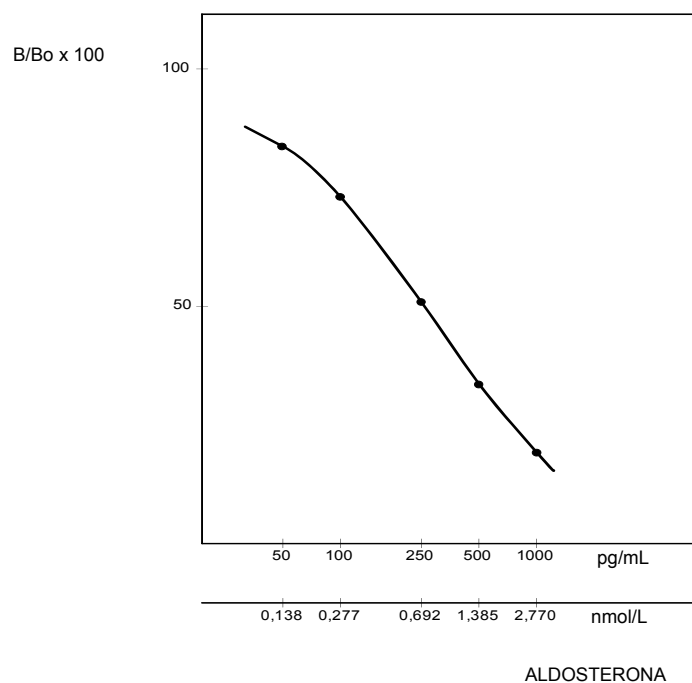


Fig. 1

8. DATOS CLÍNICOS

Examinando una población de sujetos normales con una aportación de sodio de 100-150 mEq/24 horas, se han obtenido los siguientes intervalos. Se recomienda a cada laboratorio que establezca sus propios intervalos de referencia.

Sujetos normales	PLASMA, pg/mL	ORINA, µg/24 horas
Posición supina	7,5 - 150	2,8 - 30,0
Posición erguida	35 - 300	

La conversión en nmol de aldosterona/L se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{nmol aldosterona/L} = \text{pg aldosterona/mL} \times 2,77 \times 10^{-3}$$

9. PRESTACIONES METODOLÓGICAS DEL KIT

9.1. Especificidad analítica

La especificidad analítica se define como la capacidad que tiene el test para detectar exactamente el analito ante la presencia de factores potencialmente interferentes en la matriz de la muestra (por ejemplo, anticoagulantes, hemolisis, efectos de tratamientos de la muestra) o de reacciones cruzadas con analitos potencialmente interferentes.

Interferencias. Estudios controlados sobre los factores potencialmente interferentes han demostrado que las prestaciones del test no están influenciadas por lipemia (hasta 500 mg/dL de triglicéridos), bilirrubinemia (hasta 20 mg/dL de bilirrubina). Los valores de aldosterona obtenidos con las muestras que contengan 200 mg/dL de hemoglobina resultan aproximadamente del 10% superiores a los valores obtenidos con las muestras normales.

En los estudios de interferencia de los anticoagulantes se han recogido muestras de suero y de plasma (obtenidas con la heparina de litio y el EDTA de potasio) de 41 voluntarios sanos. Todas las muestras han sido analizadas con el método estándar, con los siguientes resultados:

N.	Muestra	Suero	Heparina	EDTA
41	media (pg/mL)	181,6 (100%)	183,9 (101,3%)	197,1 (108,5%)

Los resultados de estos análisis demuestran que los valores de aldosterona obtenidos con las muestras de plasma con EDTA de potasio resultaban aproximadamente del 10% superiores a los valores obtenidos con las muestras de suero o de plasma con heparina de litio.

Reacciones cruzadas. Los porcentajes de reacciones cruzadas, calculados según Abraham, muestran la especificidad del antisuero usado.

- Aldosterona	100%
- 3 beta, 5 alfa-tetrahidroaldosterona	4.2%
- 3 alfa, 5 beta-tetrahidroaldosterona	0.3%
- Cortisolona	$6.4 \times 10^{-3}\%$
- 18-OH-desoxicorticosterona	$5.0 \times 10^{-3}\%$
- Corticosterona	$4.0 \times 10^{-3}\%$
- Cortisona	$2.5 \times 10^{-3}\%$
- Desoxicorticosterona	$1.0 \times 10^{-3}\%$
- Testosterona	$8.0 \times 10^{-4}\%$
- Prednisolona	$6.4 \times 10^{-4}\%$
- Cortisol	$1.0 \times 10^{-4}\%$
- Progesterona	$8.0 \times 10^{-5}\%$
- Espironolactona	$6.5 \times 10^{-5}\%$
- Dihidroepiandrosterona	$6.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnenolona	$5.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnantriol	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Dexametasona	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Estradiol	$1.0 \times 10^{-6}\%$

9.2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se puede expresar también como el límite de detección, es decir la cantidad mínima de analito específico que el test puede detectar. El límite de detección es de 10 pg/mL (0,0275 nmol/L) al 95% de confianza. Ha sido calculado como la concentración aparente de analito distinguible del calibrador cero, es decir, dos desviaciones estándar por debajo de cero.

9.3. Precisión

La repetibilidad y la reproducibilidad del ensayo (es decir las variaciones intra-ensayo e inter-ensayo) han sido determinadas utilizando las muestras de referencia en diferentes concentraciones de analito.

Repetibilidad	A	B	C
Número de determinaciones	10	10	10
Media (pg/mL)	86,4	249,9	495,6
Desviación estándar	4,60	9,50	8,60
Coficiente de variación (%)	5,3	3,8	1,7

Repetibilidad	A	B	C
Número de determinaciones	15	15	15
Media (pg/mL)	91,3	230,3	607,5
Desviación estándar	5,72	7,90	26,40
Coficiente de variación (%)	7,0	3,4	4,3

9.4. Veracidad

La veracidad del ensayo ha sido controlada mediante los test de dilución y recuperación.

Test de dilución. Se han determinado diluciones en serie de dos sueros de concentración elevada de aldosterona realizadas en el calibrador cero.

Dilución	Concentración esperada, pg/mL	Concentración medida, pg/mL	% Recuperación
no diluido	–	706,0	–
1:2	353,0	360,5	102,1
1:4	176,5	167,7	95,0
1:8	88,3	92,7	105,0
1:16	44,1	43,0	97,5
no diluido	–	355,0	–
1:2	177,5	165,0	93,0
1:4	88,8	92,7	104,5
1:8	44,4	46,0	103,7
1:16	22,2	25,7	115,8

Test de recuperación. Se han determinado dos sueros que contengan aldosterona, tanto no diluido`s como después de la adición de cantidades crecientes de aldosterona.

Concentración adicionada, pg/mL	Concentración esperada, pg/mL	Concentración medida, pg/mL	% Recuperación
–	–	147,0	–
520	659,7	713,0	108,1
300	439,7	469,0	106,7
180	319,7	305,0	95,4
40	179,7	177,0	98,5
–	–	291,0	–
520	796,5	815,0	102,3
300	576,5	573,0	99,4
180	456,5	435,0	95,3
40	316,5	321,0	101,4

10. LIMITACIONES DEL ENSAYO

El significado clínico de la determinación de los niveles de aldosterona se puede invalidar si la aportación diaria de sodio y potasio o la postura del paciente no se tienen bajo control, o cuando se suministren fármacos como diuréticos, clonidina, agentes beta-bloqueantes, reserpina, alfa-metildopa, etc.

El diagnóstico no se debe formular en base al resultado de un solo ensayo, sino que éste se debe validar con otras pruebas clínicas, procedimientos diagnósticos y con la opinión del médico.

La contaminación bacteriana o las repetidas congelaciones/descongelaciones de las muestras pueden modificar los resultados del test.

Para obtener resultados fiables, es necesario respetar estrictamente las instrucciones de utilización y poseer una adecuada técnica manual. En concreto, la precisión y el cuidado en las fases de reconstitución y distribución de los reactivos y de aspiración son indispensables para la fiabilidad del ensayo.

Resultados no reproducibles se deben principalmente a factores metodológicos, como por ejemplo:

- cambio de las tapas entre los viales
- uso de la misma punta para la recogida de diferentes viales o para dispensar diferentes muestras
- viales que se han dejado abiertos durante un largo período de tiempo
- exposición de los reactivos o de las muestras a calor intenso o a fuertes fuentes de contaminación bacteriana
- aspiración inadecuada de la mezcla de incubación

- contaminación del borde de los tubos con el trazador o bien con las muestras
- oscilaciones casuales o mal mantenimiento del contador gamma
- intercambio de reactivos procedentes de diferentes lotes.

11. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Todas las unidades de suero o plasma utilizadas para la fabricación de los componentes de este kit se han analizado y se han determinado no reactivas para HBsAg, para anti-HCV y para anti-HIV-1/2. Sin embargo, visto que ningún método puede asegurar que los agentes patógenos estén ausentes, todo el material de origen humano se debería considerar potencialmente infeccioso y ser manipulado como tal.

12. NORMAS DE SEGURIDAD

- No coma, beba, fume o se maquille durante la ejecución del ensayo.
- No pipetee las soluciones con la boca.
- Evite el contacto directo con el material potencialmente infeccioso usando batas de laboratorio, gafas de protección y guantes desechables. Lávese cuidadosamente las manos al terminar el ensayo.
- Evite salpicaduras o formación de aerosoles. En caso de que esto sucediera, cada gota de reactivo se debe eliminar con una solución de hipoclorito sódico al 5% y el medio utilizado se deberá tratar como material residuo potencialmente infeccioso.
- Todas las muestras, los reactivos biológicos del kit y los materiales usados para efectuar el ensayo se deben considerar capaces de transmitir agentes infecciosos; por lo tanto, los residuos se deberán eliminar de acuerdo con las reglamentaciones de las agencias autorizadas que tengan jurisdicción sobre el laboratorio y con las normativas de cada país. El material desechable deberá ser incinerado; los residuos líquidos deberán ser descontaminados con una solución de hipoclorito sódico a una concentración final del 5% durante media hora como mínimo. Cualquier material que pueda ser reutilizado deberá ser tratado en autoclave con un tratamiento de exceso (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente se considera que una hora a 121°C es un tiempo de esterilización adecuado; sin embargo se recomienda a cada usuario que verifique la eficacia del ciclo de descontaminación mediante una validación inicial y el uso rutinario de indicadores biológicos.

13. REGLAS BÁSICAS DE SEGURIDAD CONTRA LAS RADIACIONES

Reactivos con contenido de azida sódica

Este equipo contiene material radiactivo que no supera de 2,17 μCi (81 kBq) de yodo-125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas in vitro clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales.

Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución decontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjugarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

ATENCIÓN: La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

ESQUEMA DEL ENSAYO

- 1 - ENSAYE DIRECTAMENTE LAS MUESTRAS DE SUERO O PLASMA.
HIDROLICE LAS MUESTRAS DE ORINA CON HCl 0,1 N DURANTE 18-22 HORAS A 30°C.
- 2 - RECONSTITUYA LOS REACTIVOS. MARQUE LOS TUBOS RECUBIERTOS POR DUPLICADO.
- 3 - DISTRIBUYA LOS REACTIVOS SEGÚN EL SIGUIENTE ESQUEMA Y AGITE LA MEZCLA DE INCUBACIÓN:

REACTIVOS \ TUBOS	CAL 0	CAL 1-5	MUESTRAS (SUERO)	MUESTRAS (ORINA HIDROLIZ.)
CALIBRADOR CERO	200 µL	-	-	200 µL
CALIBRADORES 1-5	-	200 µL	-	-
MUESTRAS (SUERO)	-	-	200 µL	-
MUESTRAS (ORINA HIDROLIZADA)	-	-	-	10 µL*
TRAZADOR	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

- 4 - INCUBE DURANTE 18-22 HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE.
- 5 - ASPIRE LA MEZCLA DE INCUBACIÓN.
- 6 - MIDA LA RADIOACTIVIDAD DE LOS TUBOS.

* 20 µL para las muestras con bajos niveles de aldosterona.

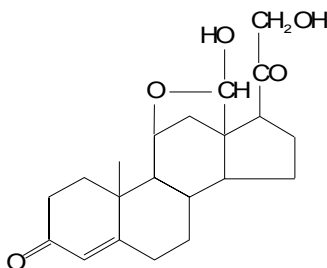
TESTE RADIOIMUNOLÓGICO DA ALDOSTERONA

Procedimento para a determinação quantitativa da aldosterona em amostras de soro, plasma ou urina humanos

Só para uso in vitro

1. INTRODUÇÃO

A aldosterona é uma hormona esteróide de peso molecular 360,4 dáltons, com a seguinte fórmula química:



A aldosterona é secretada pela zona glomerular do córtex supra-renal. É, de longe, o regulador mais potente da excreção de electrólitos na urina.

A aldosterona liga os receptores proteínicos específicos nas células renais onde, provavelmente, induz a síntese de ARN mensageiro do ADN com consequente formação de nova proteína. O papel desta proteína é controverso, mas acredita-se que facilite a entrada do sódio nas células portadoras ou forneça a estas células uma maior energia para o transporte activo de sódio. Em ambos os casos, o seu efeito manifesta-se com um aumento do transporte do sódio (reabsorção).

No nefrónio distal, a acção da aldosterona manifesta-se com um aumento da reabsorção de iões de sódio e cloro do lume tubular e com um aumento da eliminação de iões de potássio e hidrogénio no lume tubular. A reabsorção de iões de sódio e cloro tende a aumentar a osmolalidade do líquido extracelular. O aumento da osmolalidade extracelular estimula a secreção de ADH e a ADH, por sua vez, facilita a retenção de água pelo rim. Os iões de sódio, cloro e água são, geralmente, retidos ou excretados juntos: portanto, pode-se dizer que a aldosterona estimula, indirectamente, a reabsorção de água dos túbulos renais.

O mecanismo que regula a secreção de aldosterona responde às modificações da hidratação corporal. O sistema renina-angiotensina é o principal mediador da resposta do córtex supra-renal às modificações da hidratação corporal. As condições que reduzem o volume de líquido extracelular e as que resultam em sequestro do sangue venoso tendem a estimular a produção de renina e, por conseguinte, a de angiotensina. A angiotensina não só age directamente no sistema vascular como agente hipertensor, mas também estimula a secreção de aldosterona pelo córtex supra-renal.

A secreção de aldosterona também é influenciada directamente por:

1. Variações da concentração plasmática ou tecidual de potássio: a depleção de potássio diminui, enquanto que o excesso de potássio estimula a secreção de aldosterona.
2. Secreção de ACTH.
3. Variações da concentração plasmática ou tecidual de sódio: a depleção de sódio estimula, enquanto que o excesso de sódio diminui a secreção de aldosterona.

O ensaio da aldosterona pode ser feito no plasma, no soro ou na urina de 24 horas.

A determinação do conjugado-18-OH da aldosterona na urina de 24 horas reflecte integralmente a situação secretória diária, enquanto a determinação da aldosterona plasmática é mais adequada para estudos específicos. Tendo em conta o rápido catabolismo da aldosterona, o seu ensaio no plasma é muito útil na avaliação das variações agudas (ritmo circadiano, mudanças de posição, estimulações e inibições de pouca duração devidas aos medicamentos). Do ponto de vista clínico, é necessário ressaltar, porém, que os valores plasmáticos de aldosterona reflectem só a condição num dado momento do dia. Dado que a secreção da aldosterona plasmática tem uma ocorrência episódica que segue um ritmo circadiano, pode não ser válido tirar conclusões a partir duma determinação única.

2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O princípio do ensaio consiste na competição entre aldosterona marcada e aldosterona contida nos calibradores ou nas amostras para o número fixo e limitado de sítios de anticorpos. Após a incubação, a quantidade de aldosterona marcada ligada ao anticorpo fixado nos tubos revestidos é inversamente proporcional à concentração de aldosterona não marcada presente nos calibradores ou nas amostras. O método adoptado para a separação livre/ligado baseia-se no uso de tubos revestidos, onde o anticorpo é ligado às paredes dos tubos.

3. REAGENTES FORNECIDOS NO DISPOSITIVO

Tubos revestidos	100
Aldosterona marcada com ¹²⁵ I	1 frasco
Calibradores de aldosterona	6 frascos
Soro de controlo	1 frasco
Número de testes	100

ARMAZENAGEM: Depois da recepção, armazene o dispositivo a 2-8°C. Não congele. Após a abertura, os reagentes deste dispositivo permanecem estáveis até ao final do prazo de validade do dispositivo, se mantidos de modo adequado. O dispositivo foi projectado para 2 execuções analíticas se os reagentes são mantidos consoante as recomendações do fabricante.

Não utilize reagentes expirados. O prazo de validade do dispositivo está descrito na etiqueta externa e corresponde ao prazo de validade do marcador. O prazo de validade de cada reagente está descrito na etiqueta de cada frasco.

Quando reconstituir o conteúdo dos frascos, agite devagarinho para evitar a formação de espuma.

Não misture reagentes de lotes diferentes.

3.1. Tubos revestidos

A superfície interna de cada tubo é revestida com um anti-soro de coelho anti-aldosterona. Antes de usar, deixe os tubos revestidos à temperatura ambiente antes de abrir a embalagem, para evitar condensação de humidade.

Conserve os tubos não utilizados certificando-se de que a embalagem esteja bem fechada. Não misture lotes diferentes de tubos revestidos.

3.2. Aldosterona marcada com ¹²⁵I (vermelho): reagente pronto a usar

O frasco contém 52 mL de aldosterona marcada com ¹²⁵I, soro humano sem esteróides, tampão fosfato, conservantes e um corante vermelho inerte. A radioactividade máxima é 85 kBq (2,3 µCi) na data de calibração.

3.3. Calibradores de aldosterona

Os frascos contêm quantidades crescentes de aldosterona, soro humano sem esteróides e conservantes. O volume do calibrador zero é 3 mL.

Reconstitua o conteúdo dos frascos de calibradores 1-5 com 1 mL de água destilada. As soluções resultantes contêm respectivamente 50 - 100 - 250 - 500 - 1000 pg/mL de aldosterona (0,138 - 0,277 - 0,692 - 1,385 - 2,770 nmol/L) e são estáveis durante uma semana a 2-8°C ou subdivididas em alíquotas congeladas a -20°C ou a temperatura inferior para uma conservação prolongada.

Dado que actualmente não há um padrão internacional disponível, os calibradores do dispositivo estão referenciados a uma preparação de referência interna (99% pura em cromatografia líquida de alto desempenho). Os calibradores do dispositivo são comutáveis com as amostras em análise quando foram utilizados com os reagentes e com o procedimento operativo deste teste de diagnóstico *in vitro*, consoante as recomendações do fabricante.

3.4. Soro de controlo: reagente liofilizado

O frasco contém aldosterona, soro humano e conservantes. O intervalo de concentrações de cada controlo é referido no certificado de análise e indica os limites estabelecidos pela DiaSorin para os valores de controlo que podem ser obtidos em ensaios fidedignos.

Reconstitua o conteúdo do frasco com 1 mL de água destilada. A solução resultante é estável durante uma semana a 2-8°C ou subdividida em alíquotas congeladas a -20°C ou a temperatura inferior para uma conservação prolongada.

4. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Água destilada e desmineralizada.
- Reagentes de laboratório para o teste da urina (HCl, ácido bórico).
- Material de vidro.
- Tubos descartáveis de vidro.
- Suporte para tubos.
- Micropipetas com pontas descartáveis de 10 µL (exactidão ± 3%, precisão 2%) e 200, 500 µL (exactidão ± 2%, precisão 1%).
- Agitador Vortex.
- Banho ou estufa termostáticos (37° ± 1°C).
- Sistema para aspirar a mistura de incubação.
- Contador gama para contar o iodo ¹²⁵I (definição da janela do contador: 15-80 keV - eficiência do contador: 70% - tempo de contagem: 1 min). Se a eficiência do contador é inferior a 60%, o tempo de contagem deve ser prolongado a 2 min.

5. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Recomenda-se a padronização cuidadosa da preparação do doente e das condições de colheita da amostra.

Amostras de soro ou plasma

Os anticoagulantes heparina de lítio e EDTA de potássio foram testados e podem ser utilizados neste teste (veja §9.1). O sangue deve ser colhido assepticamente por punção venosa, deixado coagular e o soro deve ser separado do coágulo tão cedo quanto possível. As amostras que contêm partículas sólidas, turvas, lipémicas ou com fragmentos de eritrócitos podem necessitar de clarificação por filtragem ou centrifugação antes de serem testadas. As amostras muito hemolisadas ou lipémicas, bem como as amostras que contêm partículas sólidas ou que exibem evidente contaminação bacteriana, não devem ser utilizadas. Se o ensaio for realizado dentro de 24 horas após a colheita das amostras, estas devem ser conservadas a 2-8°C; em caso contrário, estas devem ser subdivididas em alíquotas e conservadas a -20°C ou a temperatura inferior. Se as amostras estiverem congeladas, deixe-as descongelar e misture bem antes de utilizar. Evite ciclos repetidos de congelação e descongelação.

Se foram previstos níveis de aldosterona maiores que 1000 pg/mL, dilua com o calibrador zero fornecido no dispositivo.

Amostras de urina

Recolha a urina de 24 horas e meça o seu volume. Misture com cuidado antes de retirar uma alíquota para a análise. Acrescente 1 g de ácido bórico/100 mL de urina e conserve a 2-8°C, se o teste ocorrer dentro de 24 horas ou congele em alíquotas a -20°C ou a temperatura inferior para uma conservação prolongada.

Hidrólise da urina

A aldosterona pode ser testada nas amostras de urina após hidrólise ácida da aldosterona 18-glucuronídeo. Nas condições recomendadas, a hidrólise é completa.

- **Adicione** em tubos de vidro **100 µL de urina e 1 mL de HCl 0,1 N**.
- Feche os tubos e **incube durante 18-22 horas a 30 ± 2°C**.

6. PROCEDIMENTO DO TESTE

Deixe todos os reagentes à temperatura ambiente (20-25°C) antes do teste. Execute o teste ao menos em duplicado. Os calibradores devem ser testados em cada série de amostras de doentes. Os calibradores e as amostras devem ser submetidos ao mesmo processo e tempo de incubação.

Execute todas as etapas do teste na ordem apresentada, sem muita demora entre cada etapa.

Utilize uma ponta descartável para dispensar cada calibrador e amostra.

- Distribua os reagentes *no fundo dos tubos revestidos* segundo o esquema abaixo:

reagentes \ tubos	Calibrador zero	Calibradores 1-5	Amostras (soro)	Amostras (urina hidrolisada)
Calibrador zero	200 µL	–	–	200 µL
Calibradores 1-5	–	200 µL	–	–
Amostras (soro)	–	–	200 µL	–
Amostras (urina hidrolisada)	–	–	–	10 µL*
Marcador	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

* *Para as amostras de urina com um baixo nível de aldosterona, sugere-se usar um volume de urina hidrolisada de 20 µL.*

- **Agite** o conteúdo dos tubos com um agitador Vortex e **incube durante 18-22 horas à temperatura ambiente**.
- **Aspire** com cuidado a mistura de incubação. *Verifique se o líquido foi eliminado completamente, controlando se a ponta da pipeta de aspiração toca o fundo dos tubos revestidos. A presença de gotas aderentes nas paredes dos tubos revestidos pode provocar baixa reprodutibilidade ou resultados não fiáveis. Não devem permanecer resíduos do corante.*
- **Meça a radioactividade** dos tubos.

7. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Calcule a média das contagens para cada grupo de tubos, após ter subtraído o valor do fundo. Calcule a média das contagens de calibradores e amostras como percentagem em relação ao calibrador zero:

$$B/Bo\% = \frac{\text{contagem média de calibradores ou amostras}}{\text{contagem média do calibrador zero}} \times 100$$

Coloque as coordenadas em papel semi-logarítmico ou di-linear e faça a curva utilizando a ordenada (eixo dos y) para o valor médio da percentagem calculada para cada calibrador em função da concentração de aldosterona expressa em pg/mL ou nmol/L na abcissa (eixo dos x). Desta forma obtém-se uma curva de calibração (Fig. 1).

Amostras de soro ou plasma

Leia directamente da curva de calibração a concentração de aldosterona de cada amostra expressa em pg/mL ou nmol/L. Se a amostra tiver sido diluída, a concentração de aldosterona encontrada deve ser multiplicada pelo factor de diluição.

Amostras de urina

A excreção diária de aldosterona expressa em µg ou nmol/24 horas é calculada seguindo o procedimento abaixo.

- *Para uma amostra de urina hidrolisada do volume de 10 µL*
Multiplique o valor lido da curva de calibração por 220, de forma a obter a concentração de aldosterona na urina expressa em pg/mL ou em nmol/L. O coeficiente 220 deriva do factor de diluição da urina hidrolisada (11), multiplicado pela relação calibrador/amostra (20).
- *Para uma amostra de urina hidrolisada do volume de 20 µL*
Multiplique o valor lido da curva de calibração por 110, de forma a obter a concentração de aldosterona na urina expressa em pg/mL ou em nmol/L. O coeficiente 110 deriva do factor de diluição da urina hidrolisada (11), multiplicado pela relação calibrador/amostra (10).

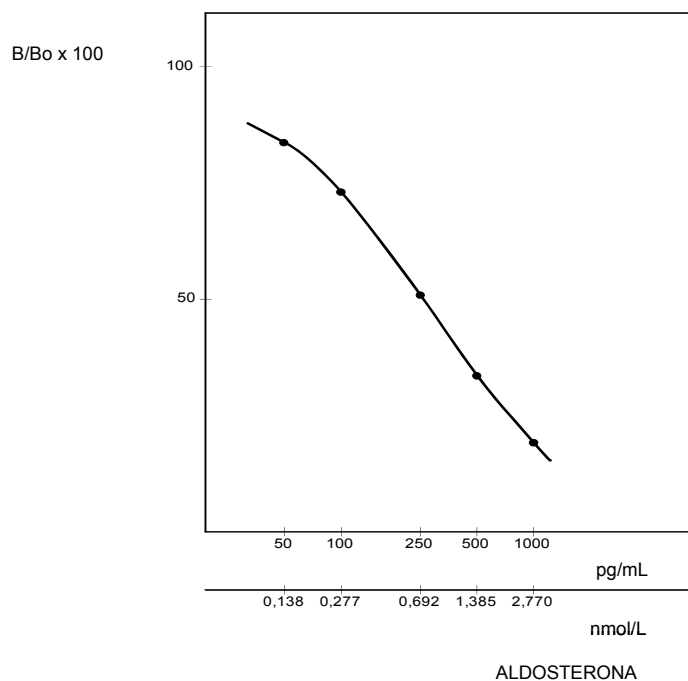


Fig. 1

Para obter a concentração da excreção diária de aldosterona, multiplique a concentração de aldosterona pelo volume de urina excretada (expressa em mL) segundo as fórmulas seguintes:

$$\begin{aligned} \mu\text{g}/24 \text{ horas} &= \text{pg/mL} \times \text{mL de urina excretada} \times 10^{-6} \\ \text{nmol}/24 \text{ horas} &= \text{nmol/L} \times \text{mL de urina excretada} \times 10^{-3} \end{aligned}$$

Exemplo de cálculo

Os seguintes dados devem ser considerados apenas como exemplo e não devem ser usados no lugar de dados obtidos pelo utilizador.

Descrição	Contagens	B/Bo x 100
Calibrador zero	10.220	100
50 pg/mL - 0,138 nmol/L	8.534	83,5
100 pg/mL - 0,277 nmol/L	7.409	72,5
250 pg/mL - 0,692 nmol/L	5.243	51,3
500 pg/mL - 1,385 nmol/L	3.352	32,8
1.000 pg/mL - 2,770 nmol/L	1.942	19,0
Amostra (soro)	6.805	66,8
Amostra (urina)	8.262	81,0

Amostra de soro

Interpolando da curva de calibração, a amostra resulta conter 140 pg/mL (0,388 nmol/L) de aldosterona.

Amostra de urina

Interpolando da curva de calibração, a amostra resulta conter 70 pg/mL (0,194 nmol/L) de aldosterona.

Tendo em conta do factor 220 e do volume total de urina excretada em 24 horas (ex. 1100 mL), a excreção diária de aldosterona é calculada da seguinte maneira:

$$\mu\text{g}/24 \text{ horas} = 70 \times 220 \times 1100 \times 10^{-6} = 15400 \times 1100 \times 10^{-6} = 16,94$$

$$\text{nmol}/24 \text{ horas} = 0,194 \times 220 \times 1100 \times 10^{-3} = 42,68 \times 1100 \times 10^{-3} = 46,95$$

8. VALORES ESPERADOS

Examinando uma população de indivíduos normais com uma introdução de sódio de 100- 150 mEq/24 horas, obteve-se os seguintes intervalos. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência clinicamente relevantes.

Indivíduos normais	PLASMA, pg/mL	URINA, $\mu\text{g}/24 \text{ horas}$
Posição supina	7,5 - 150	2,8 - 30,0
Posição erecta	35 - 300	

A conversão em nmol de aldosterona/L é feita com a seguinte fórmula:

$$\text{nmol aldosterona/L} = \text{pg aldosterona/mL} \times 2,77 \times 10^{-3}$$

9. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

9.1. Especificidade analítica

A especificidade analítica pode ser definida como a capacidade do teste de detectar com cuidado o analito específico na presença de factores potencialmente interferentes na matriz da amostra (ex. anticoagulantes, hemólise, efeitos de tratamentos da amostra) ou de reacções cruzadas com analitos potencialmente interferentes.

Interferências. Estudos controlados de substâncias ou condições potencialmente interferentes demonstraram que o desempenho do ensaio não é afectado por lipemia (até a 500 mg/dL de triglicéridos), bilirrubinemia (até a 20 mg/dL de bilirrubina). Os valores de aldosterona obtidos com as amostras que contêm 200 mg/ dL de hemoglobina resultam cerca de 10% acima dos obtidos com as amostras normais.

Nos estudos de interferência dos anticoagulantes foram recolhidas amostras de soro e de plasma (obtido com heparina de lítio e EDTA de potássio) de 41 voluntários sadios. Todas as amostras foram analisadas com o método padrão, com os seguintes resultados:

N.	Amostra	Soro	Heparina	EDTA
41	média (pg/mL)	181,6 (100%)	183,9 (101,3%)	197,1 (108,5%)

Os resultados destas análises demonstram que os valores de aldosterona obtidos com as amostras de plasma com EDTA de potássio resultam cerca de 10% acima dos obtidos com as amostras de soro ou de plasma com heparina de lítio.

Reacções cruzadas. As percentagens de reacções cruzadas, calculadas segundo Abraham, mostram a especificidade do anti-soro usado.

- Aldosterona	100%
- 3 beta, 5 alfa-tetraidroaldosterona	4.2%
- 3 alfa, 5 beta-tetraidroaldosterona	0.3%
- Cortexolona	$6.4 \times 10^{-3}\%$
- 18-OH-desoxicorticosterona	$5.0 \times 10^{-3}\%$
- Corticosterona	$4.0 \times 10^{-3}\%$
- Cortisona	$2.5 \times 10^{-3}\%$
- Desoxicorticosterona	$1.0 \times 10^{-3}\%$
- Testosterona	$8.0 \times 10^{-4}\%$
- Prednisolona	$6.4 \times 10^{-4}\%$
- Cortisol	$1.0 \times 10^{-4}\%$
- Progesterona	$8.0 \times 10^{-5}\%$
- Espironolactona	$6.5 \times 10^{-5}\%$
- Desidroepiandrosterona	$6.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnenolona	$5.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnanotriol	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Dexametasona	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Estradiol	$1.0 \times 10^{-6}\%$

9.2. Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica também pode ser expressa como o limite de detecção, ou seja, a quantidade mínima de analito específico detectável pelo teste. O limite de detecção é de 10 pg/mL (0,0275 nmol/L) com um limite de confiança de 95%. Este foi calculado como a concentração aparente de analito que pode ser distinguida do calibrador zero, isto é, dois desvios padrão abaixo do zero.

9.3. Precisão

Diferentes grupos de amostras, que contêm diferentes concentrações de analito específico, foram testados para determinar a repetibilidade e a reprodutibilidade do teste (isto é, a variabilidade intra e inter-ensaio).

Repetibilidade	A	B	C
Número de determinações	10	10	10
Média (pg/mL)	86,4	249,9	495,6
Desvio padrão	4,60	9,50	8,60
Coefficiente de variação (%)	5,3	3,8	1,7

Reprodutibilidade	A	B	C
Número de determinações	15	15	15
Média (pg/mL)	91,3	230,3	607,5
Desvio padrão	5,72	7,90	26,40
Coefficiente de variação (%)	7,0	3,4	4,3

9.4. Exactidão

A exactidão do teste foi controlada mediante os testes de diluição e recuperação.

Teste de diluição. Foram testadas diluições em série de dois soros que contêm uma concentração elevada de aldosterona efectuadas no calibrador zero.

Diluição	Concentração esperada, pg/mL	Concentração medida, pg/mL	% Recuperação
puro	–	706,0	–
1:2	353,0	360,5	102,1
1:4	176,5	167,7	95,0
1:8	88,3	92,7	105,0
1:16	44,1	43,0	97,5
puro	–	355,0	–
1:2	177,5	165,0	93,0
1:4	88,8	92,7	104,5
1:8	44,4	46,0	103,7
1:16	22,2	25,7	115,8

Teste de recuperação. Foram testados dois soros que contêm aldosterona, quer puros, quer após ter adicionado quantidades crescentes de aldosterona.

Concentração adicionada, pg/mL	Concentração esperada, pg/mL	Concentração medida, pg/mL	% Recuperação
–	–	147,0	–
520	659,7	713,0	108,1
300	439,7	469,0	106,7
180	319,7	305,0	95,4
40	179,7	177,0	98,5
–	–	291,0	–
520	796,5	815,0	102,3
300	576,5	573,0	99,4
180	456,5	435,0	95,3
40	316,5	321,0	101,4

10. LIMITAÇÕES DO TESTE

O significado clínico da determinação dos níveis de aldosterona pode ser invalidado se a introdução diária de sódio e potássio ou a postura não são mantidas sob controlo, ou quando são subministrados medicamentos como diuréticos, clonidina, agentes beta-bloqueadores, reserpina, alfa-metildopa, etc.

O diagnóstico não deve basear-se no resultado dum único teste, mas deve ser determinado conjuntamente com outros dados clínicos e meios de diagnóstico, bem como em associação com o parecer do médico.

Contaminações bacterianas ou ciclos repetidos de congelação e descongelação das amostras podem afectar os resultados do teste.

Para obter resultados fiáveis, é necessário seguir de maneira correcta as instruções de uso e possuir uma adequada formação técnica. Em especial, é essencial uma boa precisão na preparação e distribuição dos reagentes e na aspiração da mistura de incubação.

Resultados não reprodutíveis podem ser devidos a erros de execução, tais como:

- troca das tampas dos frascos
- uso da mesma ponta para distribuir soluções ou amostras diferentes
- frascos deixados abertos durante um longo período de tempo

- exposição dos reagentes ou amostras ao calor intenso ou a fontes de contaminação bacteriana
- aspiração inadequada da mistura de incubação
- contaminação dos rebordos dos tubos com o marcador ou com as amostras
- oscilações casuais ou manutenção inadequada do contador gama
- troca de reagentes de diferentes lotes.

11. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Todas as unidades de soro e plasma utilizadas para produzir os componentes deste dispositivo foram testadas para a presença de HBsAg, anti-HCV e anti-HIV-1/2 e os resultados encontrados foram não reactivos. Contudo, como nenhum método pode oferecer segurança absoluta de que agentes patogénicos estejam ausentes, todas as amostras de origem humana devem ser consideradas potencialmente infecciosas e manuseadas com cuidado.

12. REGRAS DE SEGURANÇA

- Não coma, beba, fume ou aplique cosméticos durante a execução do teste.
- Não pipete as soluções com a boca.
- Evite o contacto directo com todos os materiais potencialmente infecciosos usando equipamentos de protecção como luvas descartáveis, óculos e aventais. Lave bem as mãos no final de cada teste.
- Evite salpicos ou formação de aerossóis. Qualquer reagente derramado deve ser lavado com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% e tratado como material residual potencialmente infeccioso.
- Todas as amostras, os reagentes biológicos e os materiais utilizados nos testes devem ser considerados potencialmente capazes de transmitir agentes infecciosos. Por isso, os resíduos devem ser eliminados conforme as regras emitidas pelos órgãos autorizados que administram o laboratório e conforme o regulamento específico de cada país. O material descartável deve ser incinerado, os resíduos líquidos devem ser descontaminados com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% no mínimo durante meia hora. Qualquer material reutilizado deve ser autoclavado usando a abordagem de sobredestruição (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). Em geral, uma hora a 121°C é considerado um tempo de esterilização adequado, mas os utilizadores devem verificar a eficiência do seu sistema de descontaminação através de validação e utilização rotineira de indicadores biológicos.

13. REGRAS BÁSICAS DE SEGURANÇA CONTRA RADIAÇÃO

Reagentes com Iodo-125

Este kit contém material radioactivo que não excede 2,17 µCi (81 kBq) de Iodo-125. Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e usadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseamento e eliminação deste material.

Para médicos ou instituições que recebam rádio-isótopos sob uma licença geral:

Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática da medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínicos *in vitro* que não envolvam administração interna ou externa do material, ou a radiação deste para seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos do estado com o qual a Comissão chegou a acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve ser limitado a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve ser limitado apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo por via oral.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.
5. As áreas onde possam ocorrer fugas devem ser limpas e em seguidas lavadas com detergente álcali ou solução de descontaminação radiológica. Qualquer vidro usado deve ser enxaguado completamente em água antes de lavar qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença específica:

A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições de sua licença específica.

ATENÇÃO: O símbolo de radioactividade impresso na embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indicam a quantidade real de radioactividade na data de calibragem enquanto a embalagem indica a radioactividade teórica no kit.

ESQUEMA DO TESTE

- 1 - TESTE DIRECTAMENTE AS AMOSTRAS DE SORO OU PLASMA.
HIDROLISE AS AMOSTRAS DE URINA COM HCl 0,1 N DURANTE 18-22 HORAS A 30°C.
- 2 - RECONSTITUA OS REAGENTES. IDENTIFIQUE OS TUBOS REVESTIDOS EM DUPLICADO.
- 3 - DISTRIBUA OS REAGENTES DE ACORDO COM O ESQUEMA ABAIXO E AGITE A MISTURA DE INCUBAÇÃO:

TUBOS REAGENTES	CAL 0	CAL 1-5	AMOSTRAS (SORO)	AMOSTRAS (URINA HIDROLISADA)
CALIBRADOR ZERO	200 µL	-	-	200 µL
CALIBRADORES 1-5	-	200 µL	-	-
AMOSTRAS (SORO)	-	-	200 µL	-
AMOSTRAS (URINA HIDROLISADA)	-	-	-	10 µL*
MARCADOR	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

- 4 - INCUBE DURANTE 18-22 HORAS À TEMPERATURA AMBIENTE.
- 5 - ASPIRE A MISTURA DE INCUBAÇÃO.
- 6 - MEÇA A RADIOACTIVIDADE DOS TUBOS.

* 20 µL para as amostras com baixos níveis de aldosterona.

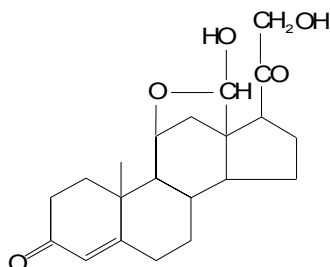
RADIOMETRISK IMMUNOASSAY FÖR BESTÄMNING AV ALDOSTERON

Förfarande för kvantitativ bestämning av aldosteron i humant serum, plasma eller urin

Endast för in vitro-användning

1. INLEDNING

Aldosteron är en steroid hormon med en molekylvikt på 360,4 dalton, och följande kemiska formel:



Aldosteron avsöndras från det glomerulära området på njurbarken. Det är den absolut mest verksamma regulatören vad det gäller utsöndring av elektrolyter i urinen.

Aldosteronet binder sig till specifika hormonella receptorer i de mottagliga njurcellerna där det antagligen inducerar syntes av messenger-RNA med bildande av nytt protein som följd. Det här proteinets funktion är inte helt klarlagt, men man antar att det antingen underlättar ingång av natrium i transportcellerna, eller att det tillför större energi till dessa celler för aktiv transport av natrium. I båda fallen visas dess effekt genom en ökad transport av natrium (resorption).

I den distala nefronen visas aldosteronets verkan genom en ökad resorption av natriumoch kloridjoner från den tubulära lumen samt en ökad avsöndring av kaliumoch vätejoner till den tubulära lumen. Resorptionen av natriumoch kloridjoner har en tendens att öka osmolalitet i extracellulärvätskan. Ökningen av extracellulär osmolalitet stimulerar utsöndring av ADH, vilken i sin tur underlättar kvarhållande av vatten från njurens sida. Natriumjoner, kloridjoner och vatten kvarhålls eller utsöndras i allmänhet tillsammans: därför kan vi säga att aldosteron stimulerar, på indirekt sätt, resorption av vatten i njurkanalerna.

Mekanismen som styr utsöndringen av aldosteron reagerar på ändringar i kroppens vätskebalans. Renin-angiotensinsystemet är den viktigaste förmedlaren vad det gäller kroppens vätskebalans. Situationerna som reducerar extracellulärvätskans volym och tillstånd som leder till kvarhållande av venöst blod har tendens att stimulera produktion av renin, och därmed även produktionen av angiotensin. Angiotensin verkar som ett pressormedel direkt på kärlsystemet och stimulerar dessutom utsöndringen av aldosteron från njurbarken.

Utsöndringen av aldosteron påverkas direkt även av:

1. Variationer i koncentrationen av kalium i plasma eller vävnader: för låga värden medför nedsättning, medan för höga värden stimulerar utsöndringen av aldosteron.
2. Utsöndring av ACTH.
3. Variationer i koncentrationen av natrium i plasma eller vävnader: för låga värden medför stimulering, medan för höga värden nedsätter utsöndringen av aldosteron.

Dosering av aldosteron kan utföras i plasma eller serum och i 24-timmarsurin.

Ur klinisk synpunkt måste understrykas att eftersom utsöndringen av aldosteron i plasma har en episodisk gång, som följer den cirkadiska rytmen, påvisar aldosteronets plasmavärden endast tillståndet under ett visst tillfälle på dagen. Detta kan leda till att resultaten inte blir pålitliga om konklusioner dras efter en enskild bestämning. Bestämning av aldosteron i 24-timmarsurin däremot påvisar den dagliga utsöndringssituationen i sin helhet. Med hänsyn till aldosteronets snabba kataboliska rytm, är testet i plasma mest lämpat för studier av akuta ändringar (cirkadisk rytm, ändringar i patientens tillstånd, kortvarig stimulering och inhibition av läkemedel), test i 24-timmars urin däremot ska väljas i fråga om kliniska undersökningar.

2. PROCEDURENS PRINCIP

Bestämning av aldosteron är en kompetitiv immunoassay, där det ¹²⁵I-märkta aldosteronet tävlar med aldosteron i kalibratorerna eller i proven om bindningställen i den fasta fasen. Den fasta fasen består av rör belagda med ett begränsat antal anti-aldosteronantikroppar. Efter en inkubation mäts mängden av det märkta aldosteronet, som är bundet i rören. Koncentrationen av det märkta aldosteronet är omvänt proportionellt med koncentrationen av omärkt aldosteron i kalibratorerna eller i proven.

3. REAGENSER SOM MEDFÖLJER

Belagda provrör	100
Aldosteron märkt med ¹²⁵ I (Tracer)	1 flaska
Kalibrаторer med aldosteron	6 flaskor
Kontrollserum	1 flaska
Antal bestämningar	100

FÖRVARING: Efter mottagningen ska detta kit förvaras vid 2-8°C. Får ej djupfrysas. Öppnad kommer reagenserna i detta kit att förbli stabila till utgångsdatum under förutsättning att de förvaras på lämpligt sätt. Detta kit är garanterat för 2 analysomgångar under förutsättning att reagenserna förvaras i enlighet med tillverkarens föreskrifter.

Använd inte reagenserna efter utgångsdatum. Angivelse om utgångsdatum för detta kit finns på ytteretiketten och motsvarar tracerns utgångsdatum. Varje komponents utgångsdatum anges på etiketten på respektive flaska.

Skaka de olika flaskorna varsamt för att undvika skumbildning vid rekonstituering av innehållet.

Blanda inte reagenser med olika lotnummer.

3.1. Belagda provrör

Varje provrörs insida har belagts med anti-aldosteron antiserum från kanin.

När de ska användas, måste de belagda provrören föras till rumstemperatur innan förpackningen öppnas för att undvika fukt-kondensering.

Icke-använda provrör ska förvaras i väl slutet förpackning. Blanda inte rör med olika lotnummer.

3.2. Aldosteron märkt med ¹²⁵I (röd): reagens klar för användning

Flaskan innehåller 52 mL aldosteron märkt med ¹²⁵I, humant serum utan steroider, fosfatbuffert, konserveringsmedel samt ett inert rött färgämne. Max radioaktivitet uppgår till 85 kBq (2,3 µCi) vid kalibreringsdatum.

3.3. Kalibrаторer med aldosteron

Varje flaska innehåller olika mängder av aldosteron, humant serum utan steroider samt konserveringsmedel.

Nollkalibrаторvolymen är 3 mL.

Lös upp innehållet i kalibrаторerna 1-5 med 1 mL destillerat vatten. Respektive lösning kommer sedan att innehålla 50 - 100 - 250 - 500 - 1000 pg/mL (0,138 - 0,277 - 0,692 - 1,385 - 2,770 nmol/L) och vara stabila i en vecka vid 2-8°C, eller uppdelat i portioner vid -20°C temperatur eller lägre för en längre tids förvaring. Eftersom ingen internationell standard finns tillgänglig för tillfället, har kalibrаторerna i kitet justerats mot ett internt referenspreparat (99% rent i HPLC). *Kalibrаторerna i kitet är jämförbara med patientproven när de används med de reagenser och arbetsprocedurer som rekommenderas av tillverkaren för utförande av detta in vitro-diagnostiska test.*

3.4. Kontrollserum: lyofiliserad reagens

Flaskan innehåller aldosteron, humant serum samt konserveringsmedel. Koncentrationsområdet för varje kontroll rapporteras på analyscertifikatet och anger gränserna som fastställts av DiaSorin för kontrollvärden som kan erhållas i tillförlitliga analysserier.

Lös upp flaskans innehåll med 1 mL destillerat vatten. Lösningen kommer att vara stabil i en vecka vid 2-8°C, eller uppdelat i portioner vid -20°C temperatur eller lägre för en längre tids förvaring.

4. NÖDVÄNDIGA MATERIAL OCH INSTRUMENT SOM INTE INGÅR

- Destillerat och avjoniserat vatten.
- Reagenser för testning av urin (HCl, borsyra).
- Glasvaror.
- Glasprovrör för engångsbruk.
- Provrörshållare.
- Mikropipetter med engångsspetsar på 10 µL (riktighet ± 3%, precision 2%) samt 200, 500 µL (riktighet ± 2%, precision 1%).
- Vortex blandare.
- Termostatreglerat system som kan hålla 37° ± 1°C.
- Aspirationssystem för inkubationsblandning.

- Gammarräknare för räkning av ^{125}I (inställning av räknarens display: 15-80 keV - räknarens effektivitet: 70% - räkningstid: 1 min). Om räknarens effektivitet skulle vara lägre än 60%, måste räkningstiden förlängas till 2 min.

5. PROVTAGNING OCH FÖRBEREDNING

Vi rekommenderar att alla patientförberedelserutiner och provtagningsförhållanden standardiseras med omsorg.

Serum- eller plasmaproov

Det går att använda antikoaguleringsmedel såsom litiumheparin och kalium-EDTA (se kap. 9.1). Ta blodprovet genom venpunktion, låt blodet koagulera och separera serumet så snabbt som möjligt. Proven som uppvisar partiklar i suspension, opalescens, lipemi eller rester av erythrocyter ska filtreras eller centrifugeras före testet. Använd inte prov som karakteriseras av kraftig hemolys eller lipemi och inte heller prov som uppvisar partiklar i suspension eller sådana där mikrobiell kontamination klart har skett. Om testet utförs inom 24 timmar från provtagningen, går det att förvara proven vid 2-8°C. I annat fall, ska de delas upp i portioner och frysas till en temperatur på -20°C eller lägre. Om proven frysts ner, ska de tinas upp och varsamt blandas om genom skakning före testet. Undvik upprepad omfrysning/tining.

Späda ut med nollkalibratorm i det fall aldosteronvärdena skulle antas bli högre än 1000 pg/mL.

Urinprov

Samla upp 24-timmarsurinen och mät volymen. Blanda noga innan du tar en portion för analys. Tillsätt borsyra (1 g/100 mL urin) och förvara vid 2-8°C om testet utförs inom 24 timmar eller frys ner i portioner vid en temperatur på -20°C eller lägre för en längre tids förvaring.

Hydrolys av urin

Aldosteron-assay kan göras i urinprov efter sur hydrolys av aldosteron 18-glukuronat. Utförd i enlighet med anvisningarna kommer fullständig hydrolys att erhållas.

- **Tillsätt 100 µL urin och 1 mL HCl 0,1 N** i glasprovrrör.
- **Täpp till provrören och inkubera i 18-22 timmar vid 30 ± 2°C.**

6. TESTPROCEDUR

Låt alla reagenser nå rumstemperatur (20-25°C) innan testet påbörjas. Alla bestämningar ska utföras minst i duplikat. Utför bestämning av kalibratorerna för varje omgång av patientprov. Kalibratorer och prov ska behandlas identiskt under hela testförfarandet.

Utför alla stegen i assayen utan avbrott i den ordning som anges i denna instruktion.

Använd engångsspetsar för pipettering av kalibratorer och prov. Byt spets mellan proven.

- Dispensera reagenserna *på de belagda provrörens botten*. Följ proceduren i tabellen nedan:

reagenser \ provrör	Nollkalibrator	Kalibratorer 1-5	Prov (serum)	Prov (hydrolyserad urin)
Nollkalibrator	200 µL	-	-	200 µL
Kalibratorer 1-5	-	200 µL	-	-
Prov (serum)	-	-	200 µL	-
Prov (hydrolyserad urin)	-	-	-	10 µL*
Tracer	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

* För urinprov med lågt aldosteronvärde tillråds användning av hydrolyserat urin med en volym på 20 µL.

- **Skaka** provrörens innehåll på Vortex och **inkubera under 18-22 timmar i rumstemperatur**.
- **Sug** noga upp inkubationsblandningen. *Kontrollera att all vätska har sugits upp (se till att spetsen på aspiratorm når ner till botten på rören). Kvarblivna droppar på rörens väggar kan ge upphov till dålig reproducerbarhet eller otillförlitliga resultat. Inget spår får lämnas av färgämnet.*
- **Mät** provrörens **radioaktivitet**.

7. BERÄKNING AV RESULTAT

Beräkna medelvärdet för varje prov i duplikat efter att ha dragit av blankvärdet. Beräkna kvoten B/Bo% för varje kalibrator och prov enligt:

$$B/Bo\% = \frac{\text{Medelvärde för kalibratorer eller prov}}{\text{Medelvärde för nollkalibrator}} \times 100$$

Överför på semilog eller linjär-linjär diagram vad som genomsnittligt beräknats som procenttal för varje kalibrator på ordinaten (y-axel) i förhållande till koncentrationen av aldosteron, uttryckt i pg/mL eller nmol/L på abscissan (x-axel). På detta sätt erhålls en kalibreringskurva (Fig. 1).

Serum- eller plasmaprov

Läs koncentrationen av aldosteron, uttryckt i pg/mL eller nmol/L, för varje prov direkt på kalibreringskurvan. Om provet har späts ut, ska den avlästa koncentrationen av aldosteron multipliceras med utspädningsfaktorn.

Urinprov

Beräkningen av den dagliga utsöndringen av aldosteron uttryckt i µg eller nmol/24 timmar utförs genom att följa anvisningarna nedan.

- *Prov av hydrolyserad urin med en volym på 10 µL*
Multiplicera värdet som avlästs på kalibreringskurvan med 220 för att erhålla koncentrationen av aldosteron i urinen i pg/mL eller nmol/L. Koefficienten 220 fås när utspädningsfaktorn för hydrolyserad urin (11) multipliceras med kvoten kalibrator/prov (20).
- *Prov av hydrolyserad urin med en volym på 20 µL*
Multiplicera värdet som avlästs på kalibreringskurvan med 110 för att erhålla koncentrationen av aldosteron i urinen i pg/mL eller nmol/L. Koefficienten 110 fås när utspädningsfaktorn för hydrolyserad urin (11) multipliceras med kvoten kalibrator/prov (10).

Koncentrationen av aldosteron som utsöndras/dag fås genom att multiplicera koncentrationen av aldosteron med volymen av utsöndrat urin (uttryckt i mL) enligt nedanstående formler:

$$\mu\text{g}/24 \text{ timmar} = \text{pg/mL} \times \text{mL av utsöndrat urin} \times 10^{-6}$$

$$\text{nmol}/24 \text{ timmar} = \text{nmol/L} \times \text{mL av utsöndrat urin} \times 10^{-3}$$

Exempel på beräkning

Nedanstående data ska endast betraktas som exempel och får inte användas i stället för de data som erhålls av användaren.

Beskrivning	cpm	B/Bo x 100
Nollkalibrator	10.220	100
50 pg/mL - 0,138 nmol/L	8.534	83,5
100 pg/mL - 0,277 nmol/L	7.409	72,5
250 pg/mL - 0,692 nmol/L	5.243	51,3
500 pg/mL - 1,385 nmol/L	3.352	32,8
1.000 pg/mL - 2,770 nmol/L	1.942	19,0
Prov (serum)	6.805	66,8
Prov (urin)	8.262	81,0

Serumprov

Resultatet vid interpolering från kalibreringskurvan blir 140 pg/mL (0,388 nmol/L) aldosteron.

Urinprov

Resultatet vid interpolering från kalibreringskurvan blir 70 pg/mL (0,194 nmol/L) aldosteron.

Med hänsyn till faktorn 220 och den totala volymen urin som uppsamlats under 24 timmar (t ex 1100 mL), beräknas den dagliga utsöndringen av aldosteron på följande sätt:

$$\mu\text{g}/24 \text{ timmar} = 70 \times 220 \times 1100 \times 10^{-6} = 15400 \times 1100 \times 10^{-6} = 16,94$$

$$\text{nmol}/24 \text{ timmar} = 0,194 \times 220 \times 1100 \times 10^{-3} = 42,68 \times 1100 \times 10^{-3} = 46,95$$

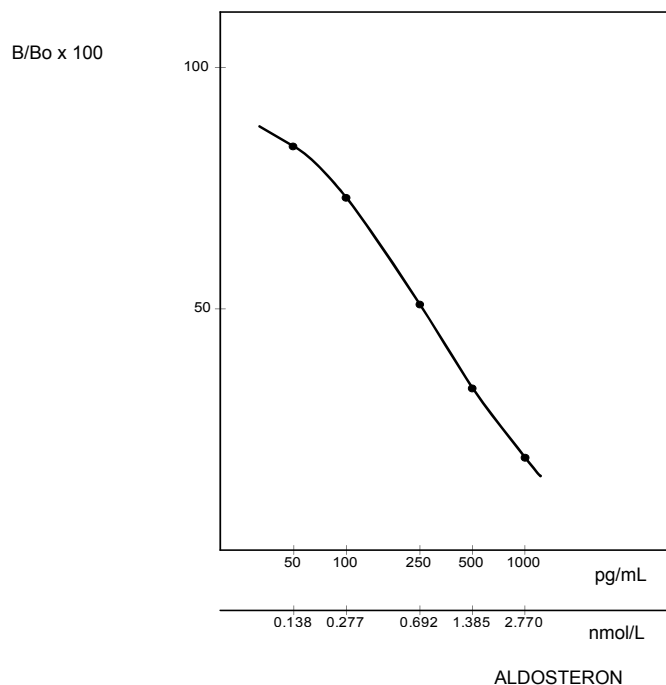


Fig. 1

8. NORMALVÄRDEN

Vid undersökning av en population av normala individer med ett natriumintag på 100-150 mEq/24 timmar, har följande intervaller erhållits. Varje laboratorium bör fastställa ett eget referensområde.

Normala individer	PLASMA, pg/mL	URIN, µg/24 timmar
Liggande	7,5 - 150	2,8 - 30,0
Stående	35 - 300	

Omvandlingen till nmol aldosteron/L utförs genom följande formel:

$$\text{nmol aldosteron/L} = \text{pg aldosteron/mL} \times 2,77 \times 10^{-3}$$

9. TESTETS PRESTANDA

9.1. Analytisk specificitet

Analytisk specificitet definieras som testets kapacitet att exakt påvisa analytet i närvaro av potentiellt störande faktorer i provet (t ex antikoaguleringsmedel, hemolys, effekter från provets behandling) eller i närvaro av korsreagerande ämnen.

Störande faktorer. Kontrollerade studier av potentiellt störande faktorer har visat att testresultaten inte påverkas av lipemi (upp till 500 mg/dL triglycerider), och bilirubinemi (upp till 20 mg/dL bilirubin). De aldosteronvärden som erhållits med prov innehållande 200 mg/dL hemoglobin visar sig vara cirka 10% högre än de som erhållits med normala prov.

För studier om interferens av antikoaguleringsmedel har serum- och plasmaprover (litiumheparin och kalium-EDTA) tagits från 41 frivilliga friska individer. Samtliga prov har undersökts genom standardmetoden och följande resultat har erhållits:

Antal	Prov	Serum	Heparin	EDTA
41	medelvärde (pg/mL)	181,6 (100%)	183,9 (101,3%)	197,1 (108,5%)

Resultaten av dessa undersökningar visar att aldosteronvärden som erhållits med kalium- EDTA plasma är cirka 10% högre än de som erhållits med litiumheparin plasma eller serum.

Korsreaktioner. Procentuella korsreaktioner, beräknade enligt Abraham, visar specificiteten hos det använda antiserumet.

- Aldosteron	100%
- 3 beta, 5 alfa-tetrahydroaldosteron	4.2%
- 3 alfa, 5 beta-tetrahydroaldosteron	0.3%
- Kortexolon	$6.4 \times 10^{-3}\%$
- 18-OH-deoxykortikosteron	$5.0 \times 10^{-3}\%$
- Kortikosteron	$4.0 \times 10^{-3}\%$
- Kortison	$2.5 \times 10^{-3}\%$
- Deoxykortikosteron	$1.0 \times 10^{-3}\%$
- Testosteron	$8.0 \times 10^{-4}\%$
- Prednysolon	$6.4 \times 10^{-4}\%$
- Kortisol	$1.0 \times 10^{-4}\%$
- Progesteron	$8.0 \times 10^{-5}\%$
- Spironolakton	$6.5 \times 10^{-5}\%$
- Dihydroepiandrosteron	$6.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnenolon	$5.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnantriol	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Dexametazon	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Estradiol	$1.0 \times 10^{-6}\%$

9.2. Analytisk känslighet

Analytisk känslighet kan även uttryckas som detektionsgräns, dvs. den lägsta koncentrationen av analytet som kan mätas med testet. Detektionsgränsen är 10 pg/mL (0,0275 nmol/L) vid 95% konfidens. Detta definieras som den lägsta koncentrationen av analytet som kan urskiljas av nollkalibratören, dvs. två standardavvikelser under noll.

9.3. Precision

Testets repeterbarhet och reproducerbarhet (dvs. inomoch mellan-assay variation) har bestämts genom användning av referensprov med olika analytkoncentrationer.

Repeterbarhet	A	B	C
Antal bestämningar	10	10	10
Medelvärde (pg/mL)	86,4	249,9	495,6
Standardavvikelse	4,60	9,50	8,60
CV%	5,3	3,8	1,7

Reproducerbarhet	A	B	C
Antal bestämningar	15	15	15
Medelvärde (pg/mL)	91,3	230,3	607,5
Standardavvikelse	5,72	7,90	26,40
CV%	7,0	3,4	4,3

9.4. Riktighet

Testets riktighet har kontrollerats genom spädningstest och test för recovery.

Spädningstest. Två serumprov med höga koncentrationer av aldosteron har späts ut i serie med nollkalibratör och testats.

Spädning	Förväntad koncentration, pg/mL	Uppmätt koncentration, pg/mL	% Återfunnet (Recovery)
outspätt	–	706,0	–
1:2	353,0	360,5	102,1
1:4	176,5	167,7	95,0
1:8	88,3	92,7	105,0
1:16	44,1	43,0	97,5
outspätt	–	355,0	–
1:2	177,5	165,0	93,0
1:4	88,8	92,7	104,5
1:8	44,4	46,0	103,7
1:16	22,2	25,7	115,8

Recovery. Två serumprov innehållande aldosteron har testats både utspädda och efter tillsats av ökade mängder av aldosteron.

Tillsatt koncentration, pg/mL	Förväntad koncentration, pg/mL	Uppmätt koncentration, pg/mL	% Återfunnet (Recovery)
–	–	147,0	–
520	659,7	713,0	108,1
300	439,7	469,0	106,7
180	319,7	305,0	95,4
40	179,7	177,0	98,5
–	–	291,0	–
520	796,5	815,0	102,3
300	576,5	573,0	99,4
180	456,5	435,0	95,3
40	316,5	321,0	101,4

10. ASSAY-PROCEDURENS BEGRÄNSNINGAR

Det kan hända att bestämningen av aldosteronvärden förklaras ogiltig ur klinisk synpunkt i det fall det dagliga införandet av natrium och kalium, eller ställningen, inte hålls under kontroll, eller om läkemedel som t ex urindrivande

medel, klonidin, betablockerare, reserpin, alfametyldopa, osv. intas.

Diagnos ska inte ställas baserade på enstaka testresultat utan ska utvärderas tillsammans med annan klinisk information och andra diagnostiska procedurer samt i enlighet med läkarens omdöme.

Bakteriell kontamination eller upprepad djupfrysning/tining av proven kan påverka testresultat.

För att erhålla tillförlitliga resultat måste bruksanvisningen följas noggrant och dessutom ska de som utför proceduren ha lämplig erfarenhet och utbildning. Särskild betoning läggs på att pipettering och aspirering ska ske med mycket god precision.

Ej reproducerbare resultat beror huvudsakligen på metodologiska faktorer, t ex:

- förväxlade kapsyler på flaskor
- användning av samma spets för pipettering till/från olika flaskor eller prov
- flaskor som lämnats öppna under lång tid
- utsättning av reagenser eller prov för hög värme eller starka bakteriella föroreningskällor
- otillräcklig aspirering av inkubationsblandningen
- kontamination av kanten på provrören med tracer eller prov
- oförutsedd oscillation eller olämplig användning av gammarräknaren
- användning av reagenser från olika batcher.

11. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Alla serum- och plasmaenheter, som används vid tillverkning av komponenterna i det här kitet, har analyserats och funnits ej reaktiva för HBsAg, anti-HCV samt för anti-HIV-1/2. Det finns dock ingen metod som kan ge absolut garanti för att patogena källor är frånvarande, därför ska allt material av humant ursprung betraktas som möjlig infektionskälla och hanteras med tanke på detta.

12. SÄKERHETSÅTGÄRDER

- Ät, drick eller rök inte och applicera inte heller kosmetiska produkter medan dosering utförs.
- Använd inte munnen vid pipettering.
- Undvik direkt kontakt med möjligt infekterat material genom att bära kläder avsedda för användning i laboratorium, skyddsglasögon och handskar för engångsbruk. Tvätta händerna noggrant efter avslutad test.
- Undvik att orsaka stänk eller aerosol. Varje droppe av biologisk reagens ska avlägsnas med hjälp av en 5% natriumhypokloritlösning och det använda medlet ska behandlas som infekterat avfall.
- Alla prov, alla biologiska reagenser i kitet samt alla material som används för att utföra testet ska anses som möjliga infektionskällor; avfallen ska därför bortskaffas i överensstämmelse med de lagföreskrifter och förordningar som gäller i landet i frågan. Engångsmaterialet ska förbrännas; flytande avfall ska dekontamineras med en 5% natriumhypokloritlösning under minst en halvtimme. Alla sorters material som ska återanvändas måste behandlas i autoklav med en viss tillämpning av *overkill* (USP 24, 2000, sid 2143). Normalt anses en timme vid 121°C vara lämplig som steriliseringstid; varje användare bör dock kontrollera dekontaminationscykelns effektivitet genom initialvalidering och rutinmässig användning av biologiska indikatorer.

13. GRUNDLÄGGANDE REGLER FÖR SKYDD MOT RADIOAKTIVA ÄMNINGAR

Reagenser innehållande radioaktivt jod-125

Detta kit innehåller radioaktivt material, som inte överskrider 2,17 µCi (81 kBq) jod-125. Tag passende förhållningsregler och överhold god laboratoriepraxis ved opbevaring, håndtering og bortskaffelse af dette materiale.

Til praktiserende læger eller institutioner, der modtager radioisotoper i h.t. en generel tilladelse:

Dette radioaktive materiale må kun modtages, erhverves, besiddes og anvendes af læger, praktiserende dyrlæger, kliniske laboratorier eller hospitaler, og kun til in vitro- eller laboratorietests, der ikke omfatter indgift eller påføring af materialet eller af stråling fra dette, til mennesker eller dyr. Modtagelse, erhvervelse, besiddelse, brug og videregivelse af dette materiale skal overholde bestemmelserne og den generelle tilladelse fra U.S. Nuclear Regulatory Commission, eller fra den stat, med hvilken kommissionen har indgået aftale om håndhævelsen af lovens krav.

1. Radioaktivt materiale må kun opbevares på et til formålet udpeget areal.
2. Adgang til radioaktivt materiale skal begrænses til særligt bemyndiget personale.
3. Afpipetter aldrig radioaktivt materiale med munden.
4. Drik eller spis aldrig på arbejdsarealer beregnet til arbejde med radioaktivt materiale.
5. Områder, hvor der kan forekomme spild, skal aftørres og derefter vaskes med et basisk rengøringsmiddel eller et særligt middel til dekontaminering af radiologisk materiale. Hvis der anvendes glasbeholdere, skal de skylles grundigt med vand, inden de vaskes op sammen med andet laboratorieudstyr af glas.

Til praktiserende læger eller institutioner, der modtager radioisotoper i h.t. en generel tilladelse:

For modtagelse, brug, videregivelse og bortskaffelse af radioaktivt materiale gælder bestemmelserne og vilkårene angivet i den pågældende tilladelse.

BEMÆRK: Indlægseddens oplysninger vedr. radioaktivitet kan afvige en smule fra den radioaktivitet, der er trykt på æskens mærkat og på tracer-glassets mærkat. Mærkaten på æsken og etiketten på tracer-glasset angiver den konstaterede radioaktivitet på kalibreringstidspunktet, mens indlægseddlen angiver kittets teoretiske radioaktivitet.

SCHEMA ÖVER ASSAYEN

- 1 - ANALYSERA SERUM- ELLER PLASMAPROVEN DIREKT.
HYDROLYSERA URINPROVEN MED HCl 0,1 N I 18-22 TIMMAR VID 30°C.
- 2 - REKONSTITUERA REAGENSERNA. MÄRK PROVRÖREN. TESTA I DUPLIKAT.
- 3 - DISPENSERA REAGENSERNA ENLIGT FÖLJANDE SCHEMA OCH BLANDA INKUBATIONSBLANDNINGEN:

PROVRÖR REAGENSER	KAL 0	KAL 1-5	PROV (SERUM)	PROV (HYDROLYS. URIN)
NOLLKALIBRATOR	200 µL	–	–	200 µL
KALIBRATORER 1-5	–	200 µL	–	–
PROV (SERUM)	–	–	200 µL	–
PROV (HYDROLYSERAD URIN)	–	–	–	10 µL*
TRACER	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

- 4 - INKUBERA UNDER 18-22 TIMMAR I RUMSTEMPERATUR.
- 5 - SUG UPP INKUBATIONSBLANDNINGEN.
- 6 - MÄT PROVRÖRENS RADIOAKTIVITET.

* 20 µL för prov med låga aldosteronvärden.

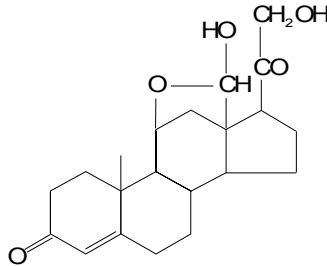
KIT TIL RADIOIMMUNOASSAY AF ALDOSTERON

Procedure ved kvantitativ aldosteronanalyse i humant prøvemateriale fra serum, plasma eller urin

Kun til brug in vitro

1. INTRODUKTION

Aldosteron er et steroidhormon med en molekylvægt på 360,4 dalton, med denne kemiske formel:



Aldosteron secerneret fra binyrebarkens zona glomerulosa. Hormonet er den kraftigste regulator ved udskillelse af elektrolytter i urinen.

Aldosteron binder sig til specifikke hormonreceptorer i de relative nyreceller, hvor det formodentlig inducerer syntesen af messenger-RNA med produktion af nyt protein til følge. Dette proteins rolle diskuteres, men man mener, det letter natriumtilførslen i vektorcellerne, eller giver disse celler mere energi på grund af en aktiv transport af natrium. I begge tilfælde er virkningen en forøget natriumtransport (reabsorption).

I den distale nefron, viser aldosteronets virkning sig som en stigning i reabsorption af natrium og klorioner fra tubuluslumen og med en stigning i eliminering af kalium og brintioner i tubuluslumen. Reabsorption af natrium og klorioner er tilbøjelig til at forøge osmolariteten i den ekstracellulære væske. Stigningen i den ekstracellulære væskes osmolaritet stimulerer sekretionen af ADH og ANP, som forbedrer nyrens vandretention. Natrium-, klorid- og vandionerne tilbageholdes og udskilles normalt sammen: man kan sige at aldosteron indirekte stimulerer absorption af vand i nyrenes tubuli.

Den mekanisme, som regulerer aldosteronsekretionen, svarer til legemets hydrationsændringer. Renin-angiotensin systemet er legemets vigtigste hydrationsformidler. De tilstande, som nedsætter mængde af den ekstracellulære væske, og dem som fremstår ved beslaglæggelse af det venøse blod, stimulerer reninproduktionen, og følgelig produktionen af angiotensin. Angiotensin virker direkte på det vaskulære system som trykagent, og desuden stimulerer det aldosteronsekretionen fra binyrebarken.

Aldosteronsekretionen er desuden direkte forbundet med:

1. Variation af kaliumkoncentration i plasma og væv: hypokaliami nedsætter mens hyperkaliami stimulerer aldosteronsekretionen.
2. ACTH-sekretionen.
3. Variation af natriumkoncentration i plasma og væv: hyponatriæmi stimulerer, mens hypernatriæmi nedsætter sekretion af aldosteron.

Aldosteronanalyse kan foretages med plasma eller serum og på døgnurin.

Da aldosteronet nedbrydes hurtigt, er en plasmaanalyse meget værdifuld til vurdering af akutte variationer (circadian rytme, positionforandring, stimuleringer og kortvarig inhibitioner). Ud fra et klinisk synspunkt skal det understreges, at med hensyn til aldosteronets plasmaværdier, udtrykker de kun tilstanden ved et bestemt tidspunkt på dagen. Da sekretionen af plasmaaldosteron er episodisk og følger en circadian rytme, kan det være værdiløst at drage en konklusion fra en enkel analyse. Bestemmelse af aldosteron i døgnurin viser en nøjagtig situation af den daglige sekretion, mens fastsættelse af plasmaaldosteron egner sig bedst til mere specifikke undersøgelser.

2. ANALYSENS PRINCIP

Analysens princip er kompetition mellem mærket aldosteron, og det aldosteron som findes i kalibratorerne eller i prøvematerialet, om antallet af faste og begrænsede antistofsteder. Efter inkubation er mængden af det mærkede aldosteron, som er bundet til antistoffet fikseret til de coatede reagensglas, omvendt proportionalt til den ikke mærkede aldosteronkoncentration, som findes i kalibratorerne eller i prøvematerialet. Metoden, som bruges til separation frit/bundet, er baseret på udnyttelse af coatede reagensglas, hvor antistoffet er fikseret på reagensglassenes vægge.

3. INDHOLD

Coatede reagensglas	100
Aldosteron mærket med ¹²⁵ I	1 flakon
Aldosteronkalibratører	6 flakoner
Kontrolserum	1 flakon
Antal assays	100

OPBEVARING: Ved modtagelsen anbringes materialet ved 2-8°C. Må ikke nedfryses. Efter åbning er reagenserne stabile indtil udløbsdatoen, hvis de opbevares korrekt. Der garanteres for 2 analytiske serier, hvis reagenserne opbevares i overensstemmelse med fabrikantens anvisninger.

Brug ikke reagenserne efter udløbsdatoen. Udløbsdatoen står på den udvendige etikette og svarer til udløbsdatoen for tracer. Udløbsdatoen for hver komponent står på de respektive flakoners etikette.

Flakonernes indhold rekonstrueres ved at ryste flaskonen forsigtigt, så man undgår skumdannelse. Bland ikke reagenser fra forskellige lot.

3.1. Coatede reagensglas

Indersiden på hvert reagensglas er betrukket med kanin-antiserum anti-aldosteron.

Når de skal bruges, anbringes de coatede reagensglas ved stuetemperatur, før beholderen åbnes, så man undgår fugtighedskondensation.

De reagensglas, som ikke bruges, skal opbevares i den tæt lukkede beholder. Bland ikke forskellige lot af coatede reagensglas.

3.2. Aldosteron mærket med ¹²⁵I (rødt): reagens klar til brug

Flakonen indeholder 52 mL aldosteron mærket med ¹²⁵I, humant serum fra steroider, fosfatbuffer, konserveringsmidler og et rødt inert farvestof. Den maksimale radioaktivitet er 85 kBq (2,3 µCi) på kalibreringsdatoen.

3.3. Aldosteronkalibratører

Hver flakon indeholder stigende mængder aldosteron, humant serum uden steroider og konserveringsmidler. Nul-kalibratørens volumen er 3 mL.

Genopret indholdet i kalibratorerne 1-5 med 1 mL destilleret vand. Opløsningerne vil henholdsvis indeholde 50 - 100 - 250 - 500 - 1000 pg/mL (0,138 - 0,277 - 0,692 - 1,385 - 2,770 nmol/L), og de er stabile i en uge ved 2-8°C eller opdelt i aliquoter ved -20°C eller ved lavere temperaturer for en længere holdbarhed.

Da der i øjeblikket ikke findes en international standard, er kalibratorerne justeret i forhold til en intern reference (ren ved 99% i HPLC). *Kittets kalibratører kan udskiftes med det undersøgte prøvemateriale, når de bruges sammen med reagenser og arbejdsprocedurer fra denne in vitro-diagnostik analyse i overensstemmelse med producentens anvisninger.*

3.4. Kontrolserum: frysetørret reagens

Flakonen indeholder aldosteron, humant serum og konserveringsmidler. Koncentrationsintervallet for hver kontrol er oplyst på analysecertifikatet og viser de grænser, som DiaSorin har fundet for kontrolværdier, der kan opnås ved pålidelige analysekørsler.

Genopret indholdet i flasken med 1 mL destilleret vand. Opløsningen er stabil i en uge ved 2-8°C eller opdelt i aliquoter ved -20°C eller ved lavere temperaturer for en længere holdbarhed.

4. TILBEHØR OG HJÆLPEREAGENSER

- Destilleret og deioniseret vand.
- Laboratoriereagenser til urinanalyse (HCl, borsyre).
- Glasvarer.
- Engangsreagensglas.
- Reagensglasholder.
- Micropipette med engangsspids på 10 µL (nøjagtighed ± 3%, præcision 2%) og 200, 500 µL (nøjagtighed ± 2%, præcision 1%).
- Vortex-mixer.
- Termostatisk system som kan fastholde 37° ± 1°C.
- Aspirationssystem til inkubationsblanding.
- Gammataæller til tælling af ¹²⁵I jod (indstilling af tællerens vindue: 15-80 keV - tælleeffektivitet: 70% - tælleetid: 1 min). Hvis tællerens effektivitet er under 60%, skal tælletiden forlænges med 2 min.

5. UDTAGNING OG TILBEREDNING AF PRØVEMATERIALERNE

Man skal standardisere patienttilberedningen og prøvematerialets udtagningsforhold meget præcist.

Serum- og plasmaprøver

Som antikoagulant kan bruges lithium-heparin og kalium-EDTA (se §9.1). Udtag venøst blod, lad det koagulere og adskil med det samme serum fra koagel. Prøver med lipæmi, erythrocytrest, eller opalagtig eller opslæmmet materiale, renses før analysen ved filtrering eller centrifugering. Brug ikke prøvemateriale som er stærkt hæmolysert eller med udtalt lipæmi, heller ikke prøver med opslæmmet materiale eller klar mikrobiel kontamination. Hvis analysen foretages indenfor 24 timer efter udtagningen, kan prøvematerialet opbevares ved 2-8°C. I modsat fald skal det deles i aliquoter og nedfryses ved -20°C eller en lavere temperatur. Hvis prøvematerialet har været frosset ned, skal det rystes grundigt, før det analyseres. Undgå gentagen optøning og nedfrysning.

Hvis man regner med aldosteronniveauer på over 1000 pg/mL, fortyndes med nulkalibratoren.

Urinprøver

Gem døgnurinen og mål volumen. Bland grundigt før der udtages en aliquot til analysen. Tilsæt borsyre (1 g/100 mL urin) og opbevar ved 2-8°C hvis analysen foretages indenfor 24 timer eller nedfrys i aliquoter ved -20°C eller lavere til længere opbevaringsperioder.

Urinhydrolyse

Aldosteron kan doseres i urinprøverne efter syrehydrolyse af aldosteron 18-glucuronat. Under de anbefalede betingelser er hydrolysen komplet.

- **Tilsæt** i reagensglas **100 µL urin** og **1 mL 0,1 N HCl**.
- Sæt prop på reagensglassene og **inkuber i 18-22 timer ved 30 ± 2°C**.

6. ARBEJDSPROCEDURE

Bring reagenserne til stuetemperatur (20-25°C) før analysen starter. Der skal laves dobbeltbestemmelser. Foretag bestemmelsen af kalibratorerne for hver analyseret prøveserie. Fremgangsmåden skal være nøjagtig ens for kalibratorer og det undersøgte prøvemateriale.

Foretag analysens faser i den fastsatte rækkefølge, uden afbrydelser.

Brug hver gang en ny engangsspids for at dispensere kalibratore og prøvemateriale.

- Fordel reagenserne i bunden af de coatede reagensglas. Følg dette skema:

reagenser \ reagensglas	Nul-Kalibrator	Kalibratore 1-5	Prøver (serum)	Prøver (hydrolyseret urin)
Nul-Kalibrator	200 µL	–	–	200 µL
Kalibratore 1-5	–	200 µL	–	–
Prøvemateriale (serum)	–	–	200 µL	–
Prøvemateriale (hydrolyseret urin)	–	–	–	10 µL*
Tracer	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

* Til urinprøver med et lavt aldosteronniveau anbefales det at bruge en hydrolyseret urinnmængde på 20 µL.

- **Ryst** reagensglassenes indhold på Vortex og **inkuber i 18-22 timer ved stuetemperatur**.
- **Opsug** inkubationsblandingen ophyggeligt. *Kontroller at al væsken fjernes, ved at sikre sig at pipettespidsen rører bunden på de coatede reagensglas. Dråber på siderne i de coatede reagensglas kan forårsage lav reproducerbarhed eller utilregnelige værdier. Der må ikke være rester fra farvestoffet.*
- **Mål** reagensglassenes **radioaktivitet**.

7. RESULTATUDREGNING

Udregn tællingernes gennemsnit for hver gruppe af reagensglas efter at have fratrukket bundværdien. Udtryk tælle gennemsnittet fra kalibratore og prøvematerialer som procentdel i forhold til nul-kalibrator:

$$B/B_0\% = \frac{\text{gennemsnit kalibratore eller prøver}}{\text{gennemsnit nul-kalibrator}} \times 100$$

Overfør til en grafisk semilog eller lineær-lineær det gennemsnit som er udregnet for hver kalibrator på ordinatorerne (y-aksen) i henhold til aldosteronkoncentrationen udtrykt i pg/mL eller nmol/L på abscisserne (x-aksen). Så får man en kalibreringskurve (Fig. 1).

Serum- og plasmaprøver

Læs aldosteronkoncentrationen på hver prøve direkte fra kalibreringskurven udtrykt i pg/mL eller nmol/L. Hvis prøven er blevet fortyndet, skal aldosteronkoncentrationen ganges med fortyndingsfaktoren.

Urinprøver

Måling af den daglige udskillelse af aldosteron udtrykt i µg eller nmol/24 timer foretages efter denne fremgangsmåde.

- *En hydrolyseret urinprøve med et rumfang på 10 µL*
Gang den værdi som læses fra kalibreringskurven med 220, så får man urinens aldosteronkoncentration udtrykt i pg/mL eller i nmol/L. Koefficienten 220 kommer fra den hydrolyserede urins fortyndingsfaktor (11), ganget med forholdet kalibrator/prøve (20).
- *En hydrolyseret urinprøve med et rumfang på 20 µL*
Gang den værdi som læses fra kalibreringskurven med 110, så får man urinens aldosteronkoncentration udtrykt i pg/mL eller i nmol/L. Koefficienten 110 kommer fra den hydrolyserede urins fortyndingsfaktor (11), ganget med forholdet kalibrator/prøve (10).

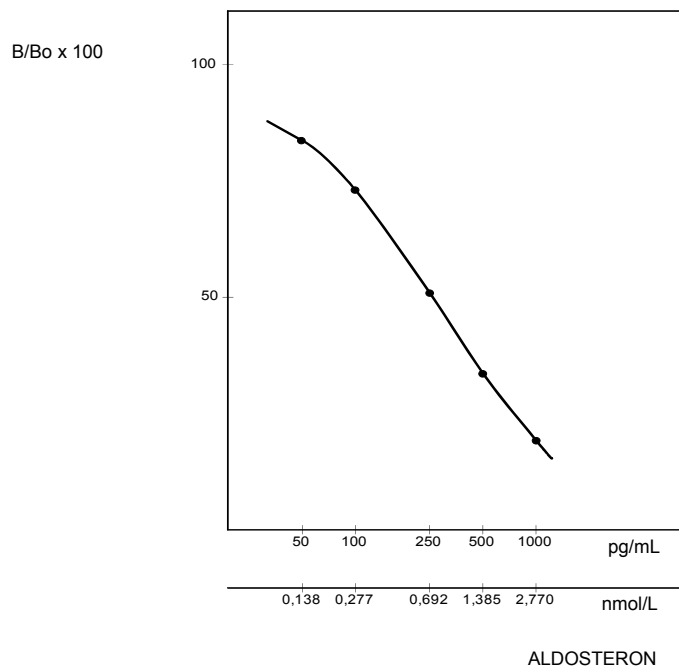


Fig.

For at få den daglige udskillelse af aldosteron, ganges aldosteronkoncentrationen med urinvolumen (udtrykt i mL) efter disse formler:

$$\mu\text{g}/24 \text{ timer} = \text{pg/mL} \times \text{mL udskilt urin} \times 10^{-6}$$

$$\text{nmol}/24 \text{ timer} = \text{nmol/L} \times \text{mL udskilt urin} \times 10^{-3}$$

Eksempel

Følgende data er kun et eksempel, og de må ikke bruges i stedet for de data, som brugeren kommer frem til.

Beskrivelse	cpm	B/Bo x 100
Nul-kalibrator	10.220	100
50 pg/mL - 0,138 nmol/L	8.534	83,5
100 pg/mL - 0,277 nmol/L	7.409	72,5
250 pg/mL - 0,692 nmol/L	5.243	51,3
500 pg/mL - 1,385 nmol/L	3.352	32,8
1.000 pg/mL - 2,770 nmol/L	1.942	19,0
Prøvemateriale (serum)	6.805	66,8
Prøvemateriale (urin)	8.262	81,0

Serumprøve

Ved at interpolere fra kalibreringskurven viser prøven sig at indeholde 140 pg/mL (0,388 nmol/L) aldosteron.

Urinprøve

Ved at interpolere fra kalibreringskurven viser prøven sig at indeholde 70 pg/mL (0,194 nmol/L) aldosteron. På basis af faktoren 220 og døgnurinens rumfang (f. eks. 1100 mL), udregnes den daglige aldosteronudskillelse således:

$$\begin{aligned}\mu\text{g}/24 \text{ timer} &= 70 \times 220 \times 1100 \times 10^{-6} &= 15400 \times 1100 \times 10^{-6} &= 16,94 \\ \text{nmol}/24 \text{ timer} &= 0,194 \times 220 \times 1100 \times 10^{-3} &= 42,68 \times 1100 \times 10^{-3} &= 46,95\end{aligned}$$

8. KLINISKE DATA

Ved undersøgelse af en gruppe raske personer med en natriumtilførsel på 100-150 mEq/ 24 timer, fremkommer følgende intervaller. Det anbefales at hvert enkelt laboratorium fastsætter sine egne referenceintervaller.

Raske personer	PLASMA, pg/mL	URIN, $\mu\text{g}/24$ timer
Liggende	7,5 - 150	2,8-30,0
Stående	35 - 300	

Omregning til nmol af aldosteron/L gøres med denne formel:

$$\text{nmol aldosteron/L} = \text{pg aldosteron/mL} \times 2,77 \times 10^{-3}$$

9. KITTETS YDEEVNER

9.1. Analytisk specificitet

Den analytiske specificitet defineres som metodens evne til alene at bestemme analytten sammen med faktorer, som potentielt interfererer i prøvematrixen (f. eks. antikoagulanter, hæmolyse, effekt fra håndtering af prøven) eller krydsreaktioner med potentielle interfererende stoffer.

Interferens. Undersøgelser, som er kontrolleret på potentielle interfererende faktorer, har vist, at ydeevnerne ikke påvirkes af lipæmi (op til 500 mg/dL triglycerider), bilirubinæmi (op til 20 mg/dL bilirubin). Aldosteronværdierne opnået med prøver, som indeholdt 200 mg/dL hæmoglobin er cirka 10% højere end dem, som man har fået fra normale prøver.

I undersøgelserne af interferens af antikoagulanter har man udtaget serum- og plasmaprøver (opnået med lithium heparin og kalium EDTA) fra 41 frivillige raske. Alle prøver er blevet analyseret med standardmetoden med følgende resultater:

N.	Prøve	Serum	Heparin	EDTA
41	middel (pg/mL)	181,6 (100%)	183,9 (101,3%)	197,1 (108,5%)

Disse analysers resultater viser at de aldosteronværdier, fra plasmaprøver som indeholder kalium-EDTA, er cirka 10% højere end resultaterne fra serumprøverne eller plasma med lithium-heparin.

Krydsreaktioner. Krydsreaktionernes procentdele, udregnet i henhold til Abraham, viser det brugte antiserums specificitet.

- Aldosteron	100%
- 3 beta, 5 alfa-tetrahydroaldosteron	4.2%
- 3 alfa, 5 beta-tetrahydroaldosteron	0.3%
- Cortexolon	$6.4 \times 10^{-3}\%$
- 18-OH-deoxycorticosteron	$5.0 \times 10^{-3}\%$
- Corticosteron	$4.0 \times 10^{-3}\%$
- Kortison	$2.5 \times 10^{-3}\%$
- Deoxycorticosteron	$1.0 \times 10^{-3}\%$
- Testosteron	$8.0 \times 10^{-4}\%$
- Prednisolon	$6.4 \times 10^{-4}\%$
- Cortisol	$1.0 \times 10^{-4}\%$
- Progesteron	$8.0 \times 10^{-5}\%$
- Spironolakton	$6.5 \times 10^{-5}\%$
- Dihydroepiandrosteron	$6.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnenolon	$5.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnantriol	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Desametazon	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Estradiol	$1.0 \times 10^{-6}\%$

9.2. Analytisk sensitivitet

Analytisk sensitivitet kan også udtrykkes som detektionsgrænse, dvs. den mindste mængde af analytten, som kan påvises præcist. Detektionsgrænsen er 10 pg/mL (0,0275 nmol/L) med 95% konfidensinterval. Den er målt som den synlige koncentration af analytten, der kan skelnes fra nul-kalibrator, eller rettere to standarddeviationer under nul.

9.3. Præcision

Prøvens repeterbarhed og reproducerbarhed (intra-analyse variation og inter-analyse variation) er fastsat ved hjælp af referenceprøver med forskellige koncentrationer af analytten.

Repeterbarhed	A	B	C
Antal bestemmelser	10	10	10
Middel (pg/mL)	86,4	249,9	495,6
Standarddeviation	4,60	9,50	8,60
Variationskoefficient (%)	5,3	3,8	1,7

Reproducerbarhed	A	B	C
Antal bestemmelser	15	15	15
Middel (pg/mL)	91,3	230,3	607,5
Standarddeviation	5,72	7,90	26,40
Variationskoefficient (%)	7,0	3,4	4,3

9.4. Korrekthed

Analysens korrekthed er kontrolleret med fortynding og recovery.

Fortynding. Man har tilsat gradvise fortyndinger af to sera med en høj koncentration af aldosteron i nul-kalibratoren.

Fortynding	Forventet koncentration, pg/mL	Målt koncentration, pg/mL	% Recovery
i det hele	–	706,0	–
1:2	353,0	360,5	102,1
1:4	176,5	167,7	95,0
1:8	88,3	92,7	105,0
1:16	44,1	43,0	97,5
i det hele	–	355,0	–
1:2	177,5	165,0	93,0
1:4	88,8	92,7	104,5
1:8	44,4	46,0	103,7
1:16	22,2	25,7	115,8

Recovery. Man har testet to sera med aldosteron, uden ekstra tilsætning og efter at have tilføjet stigende mængder aldosteron.

Tilsat koncentration, pg/mL	Forventet koncentration, pg/mL	Målt koncentration, pg/mL	% Recovery
–	–	147,0	–
520	659,7	713,0	108,1
300	439,7	469,0	106,7
180	319,7	305,0	95,4
40	179,7	177,0	98,5
–	–	291,0	–
520	796,5	815,0	102,3
300	576,5	573,0	99,4
180	456,5	435,0	95,3
40	316,5	321,0	101,4

10. BEGRÆNSNINGER VED PROCEDUREN

Den kliniske betydning ved bestemmelsen af aldosteronniveauerne kan vise sig at være ugyldig, hvis den daglige introduktion af natrium og kalium eller legemets stilling ikke holdes under kontrol, eller når der gives medicin så som diuretika, clonidin, betablokkerende midler, reserpin, alfa-metyldopa, osv.

Diagnosen må ikke stilles på basis af resultatet fra en enkelt analyse, men skal vurderes sammen med andre kliniske sammenligninger, diagnostiske procedure og lægens bedømmelse.

Bakteriel kontamination eller gentagen nedfrysning/optøning af prøvematerialet kan modificere analysens resultater.

For at få pålidelige resultater skal alle instruktioner nøje overholdes, og man skal rent teknisk håndtere alt korrekt.

Det er især vigtigt, at man er meget præcis ved pipettering og opsugning af reagenserne. Ikke reproducerbare resultater skyldes hovedsagelig metodefaktorer:

- forveksling af flaskernes kapsler
- brug af samme spids til pipettering fra forskellige flasker eller prøvematerialer
- flasker som har stået åbne i længere tid
- reagenserne eller prøvematerialerne har været udsat for stærk varme eller stærke bakterielle forureningskilder
- ukorrekt pipettering fra inkubationsblandingen
- kontamination af reagensglassenes kant med tracer eller med prøvematerialerne
- vilkårlige svingninger eller dårlig vedligeholdelse af gammamåleren
- anvendelse af reagenser fra forskellige lots.

11. ADVARSLER

Alt serum og plasma, som er brugt til fremstilling af komponenterne i dette kit, er blevet undersøgt, og har ikke reageret på HBsAg, anti-HCV og anti-HIV-1/2. Men da ingen metode med absolut sikkerhed kan udelukke tilstedeværelse af patogene mikroorganismer, bør alt humant materiale betragtes som potentielt inficeret og håndteres som sådant.

12. SIKKERHEDSREGLER

- Man må ikke spise, drikke, ryge eller tage make-up på under analysen.
- Man må ikke mundpipettere.
- Undgå direkte kontakt med det potentielle inficerede materiale ved at tage laboratoriets beklædning på, sikkerhedsbriller og engangshandsker. Vask hænderne omhyggeligt efter hver analyse og så tit som muligt
- Undgå at forårsage sprøjt eller aerosol. Enhver dråbe af biologisk reagens skal fjernes med en 5% natriumhypoklorit opløsning, og redskabet skal behandles som inficeret affald.
- Alle prøver, alle kittets biologiske reagenser og alt det materiale som er blevet brugt til analysen, skal betragtes som potentielle smittespredere; alt affald skal fjernes i overensstemmelse med de gældende normer og retlige regler i det pågældende land. Engangsmateriale skal brændes; Flydende affald skal dekontamineres med 5% koncentration af natriumhypoklorit i mindst en halv time. Alt materiale som skal genbruges, skal steriliseres i autoklave approach *overkill* (USP 24, 2000, side 2143). Normalt betragtes en time ved 121°C som en passende sterilisationstid; alle brugere bør kontrollere virkningen af dekontaminationskredsløbet med en bekræftelse ved start og løbende rutinebrug af biologiske indikatorer.

13. BESKYTTELSESREGLER MOD RADIOAKTIVITET

Reagenser indeholdende radioaktivt jod-125

Dette kit indeholder radioaktivt materiale, der ikke overskrider 2,17 µCi (81 kBq) jod-125. Tag passende forholdsregler og overhold god laboratoriepraksis ved opbevaring, håndtering og bortskaffelse af dette materiale.

Til praktiserende læger eller institutioner, der modtager radioisotoper i h.t. en generel tilladelse:

Dette radioaktive materiale må kun modtages, erhverves, besiddes og anvendes af læger, praktiserende dyrlæger, kliniske laboratorier eller hospitaler, og kun til in vitro- eller laboratorietests, der ikke omfatter indgift eller påføring af materialet eller af stråling fra dette, til mennesker eller dyr. Modtagelse, erhvervelse, besiddelse, brug og videregivelse af dette materiale skal overholde bestemmelserne og den generelle tilladelse fra U.S. Nuclear Regulatory Commission, eller fra den stat, med hvilken kommissionen har indgået aftale om håndhævelsen af lovens krav.

1. Radioaktivt materiale må kun opbevares på et til formålet udpeget areal.
2. Adgang til radioaktivt materiale skal begrænses til særligt bemyndiget personale.
3. Afpipetter aldrig radioaktivt materiale med munden.
4. Drik eller spis aldrig på arbejdsarealer beregnet til arbejde med radioaktivt materiale.
5. Områder, hvor der kan forekomme spild, skal aftørres og derefter vaskes med et basisk rengøringsmiddel eller et særligt middel til dekontaminering af radiologisk materiale. Hvis der anvendes glasbeholdere, skal de skylles grundigt med vand, inden de vaskes op sammen med andet laboratorieudstyr af glas.

Til praktiserende læger eller institutioner, der modtager radioisotoper i h.t. en generel tilladelse:

For modtagelse, brug, videregivelse og bortskaffelse af radioaktivt materiale gælder bestemmelserne og vilkårene angivet i den pågældende tilladelse.

BEMÆRK: Indlægssedlens opgivelser vedr. radioaktivitet kan afvige en smule fra den radioaktivitet, der er trykt på æskens mærkat og på tracer-glassets mærkat. Mærkaten på æsken og etiketten på tracer-glasset angiver den konstaterede radioaktivitet på kalibreringstidspunktet, mens indlægssedlen angiver kittets teoretiske radioaktivitet.

ANALYSEOVERSIGT

- 1 - ANALYSER SERUM- OG PLAMAPRØVERNE DIREKTE.
HYDROLYSER URINPRØVERNE MED 0,1 N HCl I 18-22 TIMER VED 30°C.
- 2 - GENOPRET REAGENSERNE. AFMÆRK DE COATEDE REAGENSGLAS I DUPLIKAT.
- 3 - DISTRIBUER REAGENSERNE I HENHOLD TIL FØLGENDE OVERSIGT OG RYST INKUBATIONSBLANDINGEN:

REAGENSER \ REAGENSGLAS	KAL 0	KAL 1-5	PRØVER (SERUM)	PRØVER (HYDRO- LYSERET URIN)
NUL-KALIBRATOR	200 µL	-	-	200 µL
KALIBRATORER 1-5	-	200 µL	-	-
PRØVER (SERUM)	-	-	200 µL	-
PRØVER (HYDROLYSERET URIN)	-	-	-	10 µL*
TRACER	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

- 4 - INKUBATIONSTID: 18-22 TIMER VED STUETEMPERATUR.
- 5 - OPSUG INKUBATIONSBLANDINGEN.
- 6 - MÅL REAGENSGLASSENEs RADIOAKTIVITET.

** 20 µL til prøver med et lavt aldosteronindhold.*

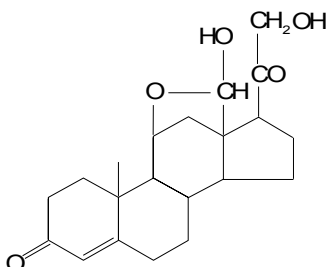
ALDOSZTERON RADIOIMMUNOESSZÉ KÉSZLET

Eljárás a kvantitatív aldosteron-meghatározáshoz humán szérum-, plazma- vagy vizeletmintákból

Kizárólag in vitro használatra

1. BEVEZETÉS

Az aldosteron egy 360,4 dalton molekulású szteroidhormon, melynek kémiai képlete a következő:



Az aldosteront a mellékvesekéreg zona glomerulosa sejtjei választják ki. Ez az elektrolit-kiválasztás leghatásosabb szabályozó anyaga.

Az aldosteron az érzékeny vesesejtekben specifikus fehérjereceptorokhoz kötődik, ahol valószínűleg DNS-irányított mRNS szintézist indukál, amely aztán új fehérje képződését eredményezi. E fehérje szerepe egyelőre ellentmondásos, de vagy a nátriumnak a transzportsejtekbe való belépését segíti elő, vagy elegendő energiával látja el ezeket a sejteket az aktív nátriumtranszporthoz. A végső hatás mindkét esetben a nátriumtranszport (visszaszívás) elősegítése.

A disztális nefronban az aldosteron hatása a nátrium- és kloridionok tubuláris lumenből történő fokozott reabszorpciójában, valamint a kálium- és hidrogénionok tubuláris lumenbe történő fokozott szekréciójában mutatkozik meg. A nátrium és a klorid reabszorpciója növeli az extracelluláris folyadék ozmolalitását. Az extracelluláris ozmolalitás növekedése serkenti az ADH kiválasztást, az ADH pedig segíti a víz renális konzerválását. A nátriumot, a kloridot és a vizet a vese rendszerint együtt tartja vissza vagy választja ki, így az aldosteronról elmondható, hogy – közvetetten – a víz tubuláris reabszorpcióját segíti.

Az aldosteron szekrécióját szabályozó mechanizmus a szervezet hidráltási állapotára reagál. A szervezet hidráltási állapotára reagáló adrenokortikális válasz fő mediátora a renin-angiotenzin rendszer. Az extracelluláris folyadéktér csökkentését, valamint a vénás vér szűkülését előidéző állapotok mind serkentik a renintermelést, így fokozzák az angiotenzin képződését. Az angiotenzin amellest, hogy presszorágensként közvetlenül hat az érrendszerre, aldosteron kiválasztására stimulálja a mellékvesekérget.

Az aldosteronszekréciót emellett a következők is befolyásolják:

1. A testfolyadékok káliumkoncentrációja: a káliumhiány csökkenti, míg a káliumretenció növeli az aldosteron elválasztását.
2. Az ACTH-szekréció.
3. A testfolyadékok nátriumkoncentrációja: a nátriumhiány növeli, míg a nátriumretenció csökkenti az aldosteron elválasztását.

Az aldosteronszint meghatározását szérumból és plazmából, valamint 24-órás vizeletből lehet elvégezni. Klinikai szempontból szem előtt tartandó, hogy míg a 24-órás vizeletben az aldosteron 18-oxo-konjugátumának mérése a napi összesített aldosteron-elválasztást tükrözi, addig a plazmaértékek egyetlen időpontot mutatnak, és mivel a plazmaaldosteron szintje jellegzetes – cirkadián ritmust követő – kiugrásokat mutat, egyetlen meghatározásból nem feltétlenül biztonságos megalapozott következtetéseket levonni. Ezért, míg a plazmaaldosteron mérése akut vizsgálatokhoz (pl. cirkadián ritmus, poszturális változások, gyógyszerek akut hatása) megfelelőbb, addig klinikai meghatározásokhoz a 24-órás vizeletvizsgálatot kell alkalmazni.

2. AZ ESSZÉ ALAPELVE

Az esszé a kalibrátorokban és a mintákban lévő jelölt aldosteron és aldosteron közötti – az esszé során fix és korlátozott számú antitestkötőhelyért folytatott – versengésen alapul. Az inkubációt követően a csőfalon lévő antitestekhez kötött, jelölt aldosteron mennyisége fordítottan arányos a kalibrátorokban vagy a mintákban jelen lévő jelöletlen aldosteron koncentrációjával. A B/F elválasztásra adaptált módszer antitesttel bevont csövek használatán alapul, ahol az antitest a csőfalra kötve található.

3. A KÉSZLETBEN LÉVŐ REAGENSEK

Bevont csövek	100
¹²⁵ I-jelölt aldosteron	1 üveg
Aldosteron kalibrátorok	6 üvegcsce
Kontrollszérum	1 üvegcsce
Csővek száma	100

TÁROLÁS: Kézhezvételt követően a készletet 2-8°C-on kell tárolni. Fagyasztása tilos. Felnyitást követően, megfelelő tárolás esetén, a készlet reagensai a készlet lejáratí idejéig maradnak stabilak. A készlettel 2 esszé futtatható le, ha a reagenseket a gyártói ajánlásoknak megfelelően tárolják.

Tilos a reagensek felhasználása a lejáratí időn túl. A készlet lejáratí ideje a külső címkén olvasható, és megegyezik a nyomkövető lejáratí dátumával. Az egyes komponensek lejáratí ideje megtalálható az adott üvegcsce címkéjén.

Az üvegcsék tartalmának feloldásakor óvatosan végezze a keverést, így elkerülhető a habképződés.

Tilos különböző tételekből származó reagensok összekeverése.

3.1. Bevont csövek

Az egyes csövek belső felszínén nyulakban termelt aldosteronantiszérum-bevonat található.

Használat előtt – a páralecsapódás elkerülése érdekében – hozza szobahőmérsékletre a bevont csöveket, még mielőtt felnyitná a dobozt. Gondosan zárja vissza a fel nem használt csöveket tartalmazó dobozt. Ne keverjen össze különböző tételekből származó bevont csöveket.

3.2. ¹²⁵I-jelölt aldosteron (piros): használatra kész reagens

Az üveg 52 mL, ¹²⁵I-tel jelölt aldosteront, szteroidmentes humán szérumot, foszfátpuffert, tartósítószeret és inert piros festéket tartalmaz. A radioaktivitás a kalibrálás időpontjában 85 kBq (2,3 µCi) vagy kevesebb.

3.3. Aldosteron kalibrátorok

Az üvegcsék növekvő mennyiségű aldosteront, szteroidmentes humán szérumot és tartósítószeret tartalmaznak. A nulla kalibrátor üvegcséje 3 mL oldatot tartalmaz.

Oldja fel az 1-5 kalibrátorüvegcsék tartalmát 1 mL desztillált vízzel. A képződött oldatok 50 – 100 – 250 – 500 – 1000 pg/mL aldosteront (0,138 – 0,277 – 0,692 – 1,385 – 2,770 nmol/L) tartalmaznak, és 2-8°C-on tárolva egy hétig maradnak stabilak, hosszabb idejű tárolásuk mélyfagyasztott (-20°C-on vagy alacsonyabb hőn) aliquot-k formájában lehetséges.

Mivel jelenleg nem áll rendelkezésre nemzetközi standard készítmény, a készlet kalibrátorainak referenciája egy belső referencia-készítmény (99%-os tisztaságú HPLC-vel). A készlet kalibrátorai – jelen in vitro diagnosztikus vizsgálatnak a gyártó által ajánlott reagensivel és működtetési eljárásai szerint alkalmazva – felcserélhetőséget mutatnak a betegmintákkal.

3.4. Kontrollszérum: liofilizált reagens.

Az üvegcsé aldosteront, humán szérumot és tartósítószerket tartalmaz. Minden egyes kontroll koncentrációtartományára jelentésre kerül az elemzési igazoláson, és jelzi azokat a DiaSorin által a kontrollértékek számára megállapított határértékeket, amelyek megbízható assay-futtatások során szerezhetőek meg.

Oldja fel az üvegcsé tartalmát 1 mL desztillált vízzel. A képződött oldat 2-8°C-on tárolva egy hétig marad stabil, hosszabb idejű tárolása mélyfagyasztott (-20°C-on vagy alacsonyabb hőn) aliquot-k formájában lehetséges.

4. SZÜKSÉGES, DE NEM SZOLGÁLTATOTT FELSZERELÉS ÉS ANYAGOK

- Desztillált vagy ioncserélt víz.
- Laboratóriumi reagensek (HCl, bórsav) a vizeletesszéhez.
- Üvegedények.
- Eldobható üvegcsövek.
- Teszt kémcsőrekesz.
- Eldobható végű mikropipetták (10, 200, 500 µL) (10 µL: valódiság +/- 3%, pontosság 2%; 200, 500 µL: valódiság +/- 2%, pontosság 1%)
- Vortex keverő.
- Termosztát-vezérelt vízfürdő vagy 37° +/- 1°C hőt fenntartani képes fűtőblokk.
- Az inkubációs keverék aspirációjára alkalmas eszköz.
- ¹²⁵I számlálására alkalmas gammaszámláló (számlálóablak beállítása: 15-80 keV – számláló hatékonysága: 70% - számlálási idő: 1 perc). Ha a számlálási hatékonyság 60% alatti, a számlálási időt 2 percre kell nyújtani.

5. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

A betegelőkészítés és a mintavételi körülmények gondos standardizálása erősen ajánlott.

Szérum- vagy plazmaminták

Az elvégzett tesztek alapján a kálium-EDTA és lítium-heparin nevű antikoagulánsok használhatók az esszéhez (lásd a 9.1 bekezdést).

A vért aseptikus technikával vénából kell nyerni, hagyni kell megalvadni, majd a lehető legkorábban el kell választani a szérumot az alvadéktól. A részecskeszerű anyagot, vörösvértest-törmelékét tartalmazó, illetve zavaros vagy lipémiás minták esetében a vizsgálat előtt szükség lehet szűréssel vagy centrifugálással történő tisztításra. A nagymértékben hemolizált vagy lipémiás, illetve a nagy mennyiségű részecskét tartalmazó, továbbá az egyértelműen mikrobiális kontaminációval rendelkező mintákat nem szabad vizsgálni. Ha a vizsgálat a mintavételt követő 24 órán belül megtörténik, a mintákat 2-8°C között kell tárolni. Egyéb esetben a mintákból aliquot-kat kell készíteni, és mélyfagyasztva kell őket tárolni (-20°C vagy alacsonyabb hőmérsékleten). Amennyiben a mintákat fagyasztva tárolja, vizsgálat előtt alaposan keverje fel a felengedett mintákat. Kerülje a többszörös lefagyasztást és felengedést.

Amennyiben a várható aldosteronszint 1000 pg/mL feletti, a mintákat fel kell hígítani a nulla kalibrátorral.

Vizeletminták

Gyűjtsön 24-órás vizeletet, mérje le és jegyezze fel a térfogatot. Vizsgálni kívánt aliquot levétele előtt keverje fel jól a vizeletet. Adjon hozzá 100 mL-enként 1 g bórsavat, ezután a keverék 2-8°C-on egy napig tárolható, hosszabb tároláshoz készítsen mélyfagyasztott (-20°C-on vagy alacsonyabb hőn) aliquot-kat.

A vizelet hidrolízise

A vizeletmintákban az aldosteron az aldosteron-18-glukuroniddá történt savas hidrolízist követően vizsgálható. Az esszéhez ajánlott feltételek mellett a hidrolízis teljes.

- **Keverjen össze 100 µL vizeletet és 1 mL 0,1N-os HCl-t.** Ehhez üveg kémcsöveket kell használni.
- **Zárja le a csöveket, és inkubálja egy éjszakán (18-22 órán) át 30 +/- 2°C-on.**

6. AZ ESSZÉ MENETE

Az esszé megkezdése előtt hozzon minden reagenst szobahőmérsékletre (20-25°C). Legalább két példányban végezze az esszét. Minden sorozat betegmintával kalibrátorokat is kell futtatni. A kalibrátorokat és a mintákat ugyanazon folyamatnak és inkubációs időnek kell alávetni.

Az esszé valamennyi lépését a megadott sorrendben végezze, a lépések közötti jelentős késedelem nélkül.

Minden egyes kalibrátor és minta szétméréséhez külön tiszta, eldobható hegyet kell használni.

- A reagenseket a *bevont csövek aljára* kell adagolni. A következő séma szerint végezze az esszét:

csövek reagensek	Nulla kalibrátor	Kalibrátorok 1-5	Szérumminták	Vizeletminták
Nulla kalibrátor	200 µL	–	–	200 µL
Kalibrátorok 1-5	–	200 µL	–	–
Szérumminták	–	–	200 µL	–
Vizeletminták	–	–	–	10 µL*
Nyomkövető	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

* A várhatóan alacsony aldosteronszinttel bíró vizeletmintákhoz 20 µL hidrolizált vizeletet kell használni.

- **Keverje össze** a csövek tartalmát Vortex keverőn, majd **inkubálja egy éjszakán** (18-22 órán) **át szobahőmérsékleten**.
- Óvatosan **szívja fel** az inkubációs keveréket. *Ügyeljen rá, hogy az aspiráló eszköz hegye hozzáérjen a bevont cső aljához, és így az összes folyadék eltávolításra kerüljön. A kitapadt oldat megfelelő felszívásának elmulasztása rossz reprodukálhatósághoz és hamis eredményekhez vezethet. Nem maradhat látható festéknyom.*
- **Mérje le a csövek radioaktivitását.**

7. AZ EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

Számítsa ki az egyes kémcsőcsoportok átlagos nettó számlálási összegét. Számítsa ki az egyes kalibrátorok és ismeretlen minták B/Bo arányát a következők szerint:

$$B/Bo\% = \frac{\text{kalibrátor vagy minta átlagos számlálási összege}}{\text{nulla kalibrátor átlagos számlálási összege}} \times 100$$

Ábrázolja az egyes kalibrátorok átlagos százalékos értékeit félogaritmikus vagy lineáris koordináták szerint az ordinátán (y tengelyen) úgy, hogy a pg/mL-ben vagy nmol/L-ben kifejezett aldosteron-koncentráció az abszcisszán (x tengelyen) legyen. Így egy kalibrációs görbe jön létre (1. ábra).

Szérum- vagy plazmaminták

Olvassa le az egyes minták pg/mL-ben vagy nmol/L-ben kifejezett aldosteron-koncentrációját közvetlenül a kalibrációs görbéről. Ha a minta hígítva volt, akkor a hígított mintából számított aldosteron-koncentrációt meg kell szorozni a hígítási faktoral.

Vizeletminták

A µg vagy nmol/24 óra egységekben kifejezett napi aldosteron-koncentrációt a következők szerint kell kiszámítani.

- *10-µL mintatérfogatú hidrolizált vizelet esetén*
Szorozza meg a kalibrációs görbéről leolvasott értéket 220-szal ahhoz, hogy megkapja a vizelet aldosteron-koncentrációját pg/mL-ben vagy nmol/L-ben. A 220-as együttható a hidrolizált vizelet hígítási faktora (11) és a kalibrátor-minta arány (20) szorzatából származik.
- *20-µL mintatérfogatú hidrolizált vizelet esetén*
Szorozza meg a kalibrációs görbéről leolvasott értéket 110-zel ahhoz, hogy megkapja a vizelet aldosteron-koncentrációját pg/mL-ben vagy nmol/L-ben. A 110-es együttható a hidrolizált vizelet hígítási faktora (11) és a kalibrátor-minta arány (10) szorzatából származik.

Az egy nap alatt kiválasztott aldosteron-koncentráció kiszámításához szorozza meg az aldosteron-koncentrációt a kiválasztott vizelet (mL-ben kifejezett) térfogatával a következő képletek alapján:

$$\mu\text{g}/24 \text{ óra} = \text{pg/mL} \times \text{kiválasztott vizelet mL-ben} \times 10^{-6}$$

$$\text{nmol}/24 \text{ óra} = \text{nmol/mL} \times \text{kiválasztott vizelet mL-ben} \times 10^{-3}$$

Számítási példa

A következő adatok kizárólag például szolgálnak, és nem alkalmazhatók a felhasználó által nyert adatok helyett.

Leírás	cpm	B/Bo x 100
Nulla kalibrátor	10,220	100
50 pg/mL - 0,138 nmol/L	8,534	83,5
100 pg/mL - 0,277 nmol/L	7,409	72,5
250 pg/mL - 0,692 nmol/L	5,243	51,3
500 pg/mL - 1,385 nmol/L	3,352	32,8
1,000 pg/mL - 2,770 nmol/L	1,942	19,0
Szérumminta	6,805	66,8
Vizeletminta	8,262	81,0

Szérumminta

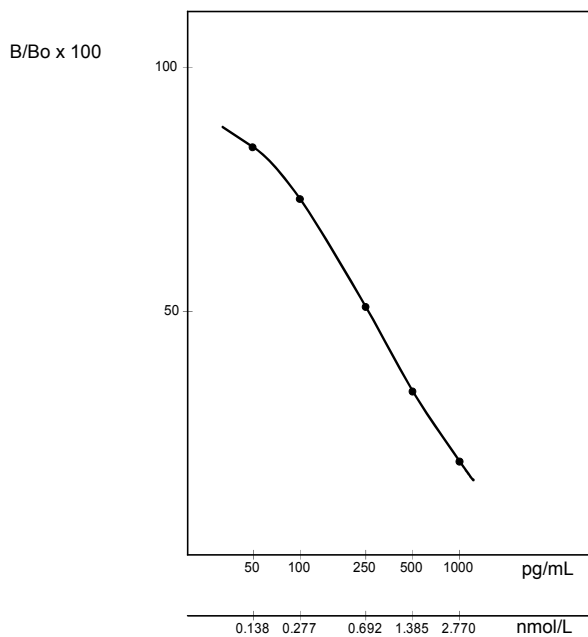
A kalibrációs görbe interpolációja alapján a minta 140 pg/mL (0,388 nmol/L) aldosteront tartalmaz.

Vizeletminta

A kalibrációs görbe interpolációja alapján a minta 70 pg/mL (0,194 nmol/L) aldosteront tartalmaz. A 220-as tényezőt és a 24 óra alatt kiválasztott vizelettérfogatot (pl. 1100 mL-t) figyelembe véve a napi aldosteron-koncentrációt a következők szerint kell kiszámítani:

$$\mu\text{g}/24 \text{ óra} = 70 \times 220 \times 1100 \times 10^{-6} = 15400 \times 1100 \times 10^{-6} = 16,94$$

$$\text{nmol}/24 \text{ óra} = 0,194 \times 220 \times 1100 \times 10^{-3} = 42,68 \times 1100 \times 10^{-3} = 46,95$$



ALDOSZTERON

1. ábra

8. VÁRHATÓ ÉRTÉKEK

Az alább megadott értékek csak jelzésértékűek, és olyan normális populációra vonatkoznak, melynek 24 órás nátriumbevitel 100-150 mEq; az egyes laboratóriumoknak maguknak kell meghatározniuk referencia-tartományukat.

Egészséges alanyok	PLAZMA, 23 pg/mL	VIZELET, µg/24 óra
Hanyattfekvő testhelyzet	7,5 - 150	2,8 – 30,0
Álló testhelyzet	35 - 300	

A nmol aldoszteron/L egységekre történő átváltás a következő képlettel lehetséges:

$$\text{nmol aldoszteron/L} = \text{pg aldoszteron/mL} \times 2,77 \times 10^{-3}$$

9. FAJLAGOS TELJESÍTMÉNYI JELLEMZŐK

9.1. Analitikai specifitás

Az analitikai specifitás azt mutatja, hogy az esszé milyen pontossággal képes a specifikus analit kimutatására a mintamátrixban lévő, esetlegesen zavaró tényezők (pl. antikoagulánsok, hemolízis, a mintafeldolgozás hatásai), illetve keresztreakáló analitek jelenlétében.

Interferencia. A potenciálisan interferenciát okozó anyagok, illetve állapotok kontrollált vizsgálata azt mutatta, hogy az esszé teljesítményét nem befolyásolja a lipémia (500 mg/dL triglicerid-koncentrációig) és a bilirubinémia (20 mg/dL bilirubin-koncentrációig). A 200 mg/dL hemoglobin-koncentrációjú minták esetében meghatározott aldoszteronértékek körülbelül 10%-kal magasabbak, mint a normál mintákéi.

Egy, az antikoagulánsok okozta interferenciát célzó vizsgálat során megegyező szérumszám- és plazmamintákat (utóbbiakat lítium-heparinnal és kálium-EDTA-val) vettünk le 41 egészséges önkéntestől. Minden mintát megvizsgáltunk a standard módszerrel, és a következő eredményeket kaptuk.

#	Minta	Szérumszám	Heparin	EDTA
41	átlag (pg/mL)	181,6 (100%)	183,9 (101,3%)	197,1 (108,5%)

E tesztek eredményei azt mutatták, hogy a kálium-EDTA-s plazmamintákban meghatározott aldoszteronértékek körülbelül 10%-kal magasabbak voltak a szérumszám- vagy lítium-heparinos plazmamintákban meghatározott értékeknél.

Keresztreakciók. A keresztreakciók Abraham szerint számított százalékos aránya a használt antiszérumszám specifitását mutatja.

- Aldoszteron	100%
- 3-béta, 5-alfa-tetrahydro-aldoszteron	4,2%
- 3-alfa, 5-béta-tetrahydro-aldoszteron	0,3%
- Kortexolon	$6,4 \times 10^{-3}\%$
- 18-OH-dezoxikortikoszteron	$5,0 \times 10^{-3}\%$
- Kortikoszteron	$4,0 \times 10^{-3}\%$
- Kortizon	$2,5 \times 10^{-3}\%$
- Dezoxikortikoszteron	$1,0 \times 10^{-3}\%$
- Tesztoszteron	$8,0 \times 10^{-4}\%$
- Prednizolon	$6,4 \times 10^{-4}\%$
- Kortizol	$1,0 \times 10^{-4}\%$
- Progeszteron	$8,0 \times 10^{-5}\%$
- Spironolakton	$6,5 \times 10^{-5}\%$
- Dehidroepiandrosteron	$6,0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnenolon	$5,0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnantriol	$3,3 \times 10^{-5}\%$
- Dexametazon	$3,3 \times 10^{-5}\%$
- Ösztradiol	$1,0 \times 10^{-6}\%$

9.2. Analitikai érzékenység

Az analitikai érzékenység kifejezhető detektálási küszöbként is, amely specifikus analitnek az a legkisebb mennyisége, amelyet az esszé még kimutatni képes. 95%-os konfidenciahatár esetén a detektálási küszöb 10 pg/mL (0,0275 nmol/L). Ez az az analit-koncentráció, amely megkülönböztethető a nulla kalibrátortól, azaz két standard deviációval a nulla alatt van.

9.3. Pontosság

Az esszé megismételhetőségének és reprodukálhatóságának (azaz az esszé közbeni és az esszék közötti változékonyság) meghatározásához több poolból, több különböző specifikus analit-koncentrációjú minta került elemzésre.

Megismételhetőség	A	B	C
Meghatározások száma	10	10	10
Átlag (pg/mL)	86,4	249,9	495,6
Szórás	4,60	9,50	8,60
Variációs koefficiens (%)	5,3	3,8	1,7

Reprodukálhatóság	A	B	C
Meghatározások száma	15	15	15
Átlag (pg/mL)	91,3	230,3	607,5
Szórás	5,72	7,90	26,40
Variációs koefficiens (%)	7,0	3,4	4,3

9.4. Valódiság

Az esszé valódiságának ellenőrzése a hígítási és visszanyerési tesztekkel történt.

Hígítási teszt. Két magas aldosteron-koncentrációjú szérumot vizsgáltunk meg sorozatos, a nulla kalibrátorral történő hígítást követően.

Hígítás	Várható koncentráció, pg/mL	Mért koncentráció, pg/mL	%-os visszanyerés
hígítatlan	–	706,0	–
1:2	353,0	360,5	102,1
1:4	176,5	167,7	95,0
1:8	88,3	92,7	105,0
1:16	44,1	43,0	97,5
hígítatlan	–	355,0	–
1:2	177,5	165,0	93,0
1:4	88,8	92,7	104,5
1:8	44,4	46,0	103,7
1:16	22,2	25,7	115,8

Visszanyerési teszt. Két aldosteront tartalmazó mintát vizsgáltunk először magukban, majd növekvő mennyiségű aldosteronnal keverve.

Hozzáadott koncentráció, pg/mL	Várható koncentráció, pg/mL	Mért koncentráció, pg/mL	%-os visszanyerés
–	–	147,0	–
520	659,7	713,0	108,1
300	439,7	469,0	106,7
180	319,7	305,0	95,4
40	179,7	177,0	98,5
–	–	291,0	–
520	796,5	815,0	102,3
300	576,5	573,0	99,4
180	456,5	435,0	95,3
40	316,5	321,0	101,4

10. AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

Az aldosteron-meghatározás klinikai jelentősége érvénytelenné válik, ha az alanyok nincsenek szabályozott nátrium- és káliumbevitel alatt, valamint ellenőrzött testhelyzetben, illetve gyógyszerek (pl. diuretikumok, klonidin, bétablokkoló szerek, rezerpin, alfa-metildopa stb.) adása esetén.

Egyetlen vizsgálati eredmény alapján nem szabad diagnózist alkotni, mert az csak a klinikai leletekkel, más diagnosztikus eljárásokkal, valamint az orvosi ítélőképesség felhasználásával állítható fel.

A minták bakteriális kontaminációja, illetve a minták ismételt lefagyasztása és felengedése befolyásolhatja az esszé eredményeit.

A megbízható eredményekhez szakképzett technika és a használati utasítások szigorú követése szükséges. Különösen elengedhetetlen a precíz pipettázás és a pontos aspiráció.

Nem reprodukálható eredményekhez vezethetnek az olyan módszertani tényezők, mint például:

- az üvegcszetetők felcserélése
- ugyanazon hegy használata különböző üvegcséből való pipettázás vagy különböző minták szétmérése során
- az üvegcsék hosszú idejű nyitva hagyása
- a reagensek vagy minták erős hőnek vagy jelentős bakteriális fertőzésforrásnak való expozíciója
- az inkubációs keverék nem megfelelő aspirációjára
- a kémcsőperemek nyomkövetővel vagy mintákkal való beszenyezése
- a gammaszámláló véletlen oszcillációja vagy nem megfelelő kezelése
- különböző mestertételekből származó reagensek felhasználása.

11. FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

Az elvégzett vizsgálatok alapján a készletben található komponensek előállításához felhasznált egyik szérumszám- és plazmaegység sem bizonyult reaktívnek HBsAg, anti-HCV, valamint anti-HIV-1/2 jelenlétére nézve. Ennek ellenére, mivel nincs módszer, amely abszolút biztonsággal ki tudná zárni kórokozók jelenlétét, az összes emberi eredetű mintát esetlegesen fertőzőnek kell tekinteni, és óvatosan kell kezelni.

12. BIZTONSÁGI ÓVINTÉZKEDÉSEK

- Az esszé-laboratóriumban tilos az étel- és ital fogyasztás, a dohányzás, illetve a kozmetikumok alkalmazása.
- Az oldatokat szájjal pipettázni tilos!
- Kerülni kell a potenciálisan fertőző anyagokkal való közvetlen érintkezést védőruházat, pl. laboratóriumi köpeny, védőszemüveg és eldobható kesztyű használatával. Az egyes esszék végeztével alaposan kezdet mosni.
- Kerülni kell az oldatok kifröcskölését, illetve az aeroszolképződést. A kiöntött reagenst 5%-os nátrium-hipoklorit oldattal fel kell mosni, és potenciálisan fertőző anyagként kell kidobni.
- Az összes, assay során használt mintát, biológiai reagenst és anyagot fertőző ágensek átvitelére képes anyagként kell kezelni. Ezeket ezért a laboratórium felett ellenőrzést gyakorló hatóságok szabályai és irányelveivel, valamint az adott ország rendelkezéseivel összhangban kell kidobni. Az eldobható anyagokat el kell égetni. A folyékony hulladékot 5%-os végső koncentrációjú nátrium-hipoklorittal kell fertőtleníteni legalább

fél órán keresztül. Minden újra felhasználandó anyagot *túlbiztosított* módon autoklávozni kell (USP 24, 2000, p. 2143). Általánosságban legkevesebb egy óra 121°C-on megfelelőnek tekinthető, de a felhasználóknak kezdeti validálással ellenőrizniük kell az alkalmazott fertőtlenítési ciklus hatékonyságát, és rutinszerűen biológiai indikátorokat kell alkalmazniuk.

13. A SUGÁRBIZTONSÁG ALAPSZABÁLYAI

A jód-125 izotópot tartalmazó reagensek

Jelen készlet olyan radioaktív jód-125 anyagot tartalmaz, amely nem haladja meg a 2,17 µCi (81 kBq) értéket. Az anyag tárolása, kezelése, valamint kidobása során megfelelő óvintézkedéseket gyakorolni, és be kell tartani a jó laboratóriumi gyakorlatot.

A radioizotópot általános engedéllyel átvevő szakemberek vagy intézmények részére:

E radioaktív anyagot kizárólag orvosok, állatorvosi tudományokat gyakorló állatorvosok, klinikai laboratóriumok, illetve kórházak vehetnek át, szerezhethetnek be, birtokolhatnak és használhatnak fel, kizárólag olyan in vitro klinikai vagy laboratóriumi vizsgálatokhoz, melyeknél az anyagot vagy az abból származó sugárzást nem alkalmazzák külsőleg vagy belsőleg az emberi lényeken vagy az állatokon. Átvétele, beszerzése, birtoklása, felhasználása és átvitele az Egyesült Államokbeli Nukleáris Szabályozó Bizottság (Nuclear Regulatory Commission) szabályozásaihoz és általános engedélyéhez kötött, illetve azon államéhoz, amellyel a Bizottság megállapodott a szabályozás gyakorlásával kapcsolatban.

1. A radioaktív anyag tárolását egy pontosan kijelölt területre kell korlátozni.
2. A radioaktív anyagokhoz való hozzáférést korlátozott tagszámú, felhatalmazott személyzetre kell korlátozni.
3. Tilos a radioaktív anyag szájjal történő pipettázása.
4. Tilos a kijelölt radioaktív munkaterületeken étel és ital fogyasztása.
5. Azon területeket, ahol az anyag kiömlhet, fel kell törölni, majd lúgos detergenssel vagy sugárfertőtlenítő oldattal fel kell mosni. A felhasznált üvegedényeket teljes mértékben ki kell öblíteni vízzel, mielőtt más laboratóriumi üvegedényekkel kerülnének mosásra.

A radioizotópot specifikus engedéllyel átvevő szakemberek vagy intézmények részére:

A radioaktív anyagok átvétele, felhasználása, átvitele és kidobása az Ön specifikus engedélyének szabályaihoz és feltételeihez kötött.

FIGYELEM: A csomagban lévő tájékoztatóra nyomtatott radioaktivitás kis mértékben különbözhet a doboz címkéjére és a nyomkövető üvegcsé címkéjére nyomtatott radioaktivitástól. A dobozcímke és a nyomkövető üvegcsé címkéje a kalibrálás időpontjában mért aktuális radioaktivitás-mennyiséget mutatja, míg a csomagban lévő tájékoztató a készlet elméleti radioaktivitását jelzi.

AZ ESSZÉ VÁZLATA

- 1 - A SZÉRUM- VAGY PLAZMAMINTÁKAT KÖZVETLENÜL VIZSGÁLJA.
A VIZELETMINTÁKAT HIDROLIZÁLJA 0,1N-OS HCl-BEN EGY ÉJSZAKÁN ÁT 30°C-ON.
- 2 - OLDJA FEL A REAGENSEKET. AZONOSÍTSA A BEVONT KÉMCSÖVEKET KÉT PÉLDÁNYBAN.
- 3 - MÉRJE SZÉT A REAGENSEKET A KÖVETKEZŐ SÉMA SZERINT, ÉS KEVERJE ÖSSZE AZ INKUBÁCIÓS KEVERÉKET:

CSÖVEK REAGENSEK	0 KAL	KAL 1-5	SZÉRUMMINTÁK	VIZELETMINTÁK
NULLA KALIBRÁTOR	200 µL	–	–	200 µL
KALIBRÁTOROK 1-5	–	200 µL	–	–
SZÉRUMMINTÁK	–	–	200 µL	–
VIZELETMINTÁK	–	–	–	10 µL*
NYOMKÖVETŐ	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

- 4 - INKUBÁLJA EGY ÉJSZAKÁN ÁT SZOBAHŐMÉRSÉKLETEN.
- 5 - ASPIRÁLJA A REAKCIÓNÉLEGYET.
- 6 - MÉRJE LE A CSÖVEK RADIOAKTIVITÁSÁT.

* 20 µL alacsony aldosteronszintek esetén.

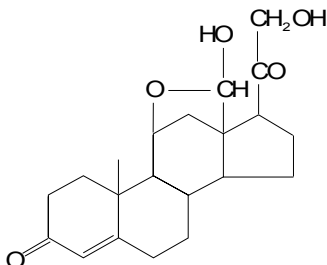
SOUPRAVA PRO RADIOIMUNOLOGICKÉ STANOVENÍ ALDOSTERONU

Postup pro kvantitativní stanovení aldosteronu ve vzorcích lidského séra, plazmy nebo moči

Určeno pouze pro použití in vitro

1. ÚVOD

Aldosteron je steroidní hormon s molekulární hmotností 360,4 daltonů, který má následující chemický vzorec:



Aldosteron vyměšuje zona glomerulosa kůry nadledvin. Je zdaleka nejsilnějším regulátorem vylučování elektrolytů. Aldosteron se váže na specifické proteinové receptory v citlivých buňkách ledvin, kde pravděpodobně indukuje syntézu mRNA, řízenou DNA, s následnou tvorbou nového proteinu. Role tohoto proteinu je zatím sporná, ale může buď usnadňovat vstup sodíku do transportních buněk, nebo jim může zajišťovat zvýšený přísun energie pro aktivní transport sodíku. V každém případě je jeho konečným účinkem zvýšený transport sodíku (resorpce).

V distální části nefronu se působení aldosteronu projevuje zvýšenou resorpcí sodných a chloridových iontů z tubulárního lumen a zvýšenou sekrecí iontů draslíku a vodíku do tubulárního lumen. Resorpce sodíku a chloridů má tendenci zvyšovat osmolalitu extracelulárních tekutin. Zvýšení extracelulární osmolality stimuluje sekreci ADH a ADH usnadňuje zadržování vody ledvinami. Sodík, chloridy a voda jsou obvykle zadržovány nebo vylučovány společně a dá se říci, že aldosteron nepřímo podporuje renální tubulární resorpci vody.

Mechanismus regulující sekreci aldosteronu reaguje na změny hydratace organismu. Hlavním mediátorem reakce kůry nadledvin na změny hydratace organismu je renin-angiotensinový systém. Podmínky, které snižují objem extracelulárních tekutin, i podmínky, které vedou k sekvestraci žilní krve, stimuluje produkci reninu, čímž zvyšují tvorbu angiotensinu. Angiotensin nejenže působí na cévní systém přímo jako činitel zvyšující krevní tlak, ale také stimuluje kůru nadledvin k sekreci aldosteronu.

Sekreci aldosteronu ovlivňuje také:

1. Koncentrace draslíku v tělesných tekutinách: ztráta draslíku snižuje sekreci aldosteronu a zadržování draslíku ji zvyšuje.
2. Sekrece ACTH.
3. Koncentrace sodíku v tělesných tekutinách: ztráta sodíku zvyšuje sekreci aldosteronu, zatímco zadržování sodíku ji snižuje.

Stanovení aldosteronu lze provádět v séru nebo plazmě i v moči sbírané za 24 hodin. Z klinického hlediska se nesmí zapomínat na to, že zatímco měření 18-oxo-konjugátu aldosteronu v moči sbírané za 24 hodin je integrovaným odrazem denní sekrece aldosteronu, hodnoty v plazmě mohou odrážet pouze jeden bod v čase a jelikož aldosteron v plazmě vykazuje typická prudká zvýšení, která sledují cirkadiální rytmus, nemusí být bezpečné činit platné závěry z jediného stanovení. Proto je měření aldosteronu v plazmě vhodnější pro akutní studie (jako jsou cirkadiální rytmy, změny polohy, akutní účinky léků), zatímco měření v moči za 24 hodin je metodou volby pro klinické výzkumy.

2. PRINCIP STANOVENÍ

Princip stanovení je založen na kompetici mezi značeným aldosteronem a aldosteronem obsaženým v kalibračních roztocích nebo ve vzorcích, které se mají analyzovat, o obsazení pevného a omezeného počtu vazebných míst protilátek. Po inkubaci je množství označeného aldosteronu navázaného na protilátky na stěnách zkumavky nepřímo úměrné koncentraci neoznačeného aldosteronu přítomného v kalibračních roztocích nebo ve vzorcích. Přijatá metoda separace B/F je založena na použití zkumavek s nanesenými protilátkami, kdy je protilátka nanášena na stěny zkumavky.

3. ČINIDLA DODANÁ V SOUPRAVĚ

Zkumavky s nanosenou vrstvou	100
Aldosteron značený ¹²⁵ I	1 láhev
Kalibrační roztoky aldosteronu	6 lahviček
Kontrolní sérum	1 lahvička
Počet zkumavek	100

UCHOVÁVÁNÍ: Po přijetí je nutno soupravu uchovávat při teplotě 2 - 8 °C. Nezmrazujte. Po otevření jsou činidla v této soupravě při správném skladování stabilní, dokud neuplyne datum jejich expirace. Tato souprava je určena k provedení 2 běhů analýz za předpokladu, že jsou činidla skladována podle pokynů výrobce.

Činidla nelze použít po uplynutí data expirace. Datum expirace soupravy je uvedeno na vnějším štítku a odpovídá datu expirace značené látky. Datum expirace jednotlivých složek je uvedeno na štítku příslušné lahvičky.

Při rekonstituci obsahu lahviček míchejte šetrně, aby nedocházelo k napěnění.

Činidla z různých šarží se nesmí navzájem kombinovat.

3.1. Zkumavky s nanosenou vrstvou

Na vnitřní povrch jednotlivých zkumavek je nanášena vrstva králičího antiséra proti aldosteronu.

Před použitím zkumavky s nanosenou vrstvou nechejte temperovat při pokojové teplotě, abyste eliminovali kondenzaci vlhkosti. Krabici s nepoužitými zkumavkami pečlivě uzavřete. Nekombinujte navzájem zkumavky s nanosenou vrstvou různých šarží.

3.2. Aldosteron značený ¹²⁵I (červený): činidlo připravené k použití

Lahvička obsahuje 52 ml aldosteronu značeného ¹²⁵I, lidské sérum bez steroidů, fosfátový pufr, konzervační látky a inertní červené barvivo. Radioaktivita je 85 kBq (2,3 µCi) nebo méně k datu kalibrace.

3.3. Kalibrační roztoky aldosteronu

Lahvičky obsahují zvyšující se množství aldosteronu, konzervačních látek a lidského séra bez steroidů. Lahvička s kalibračním roztokem pro kalibraci nuly obsahuje 3 ml roztoku.

Obsah lahviček s kalibračními roztoky 1 - 5 rekonstituuje přidáním 1 ml destilované vody. Výsledné roztoky obsahují 50 - 100 - 250 - 500 - 1000 pg/ml aldosteronu (0,138 - 0,277 - 0,692 - 1,385 - 2,770 nmol/l) a při 2 - 8 °C jsou stabilní jeden týden, nebo mohou být skladovány delší dobu hluboce zmrazené (při teplotě -20 °C nebo nižší) rozdělené na poměrné díly.

Protože v současné době není dostupný mezinárodně standardizovaný přípravek, jsou kalibrační roztoky soupravy vztahovány na interní referenční standard (99% čistota dle HPLC). Kalibrační roztoky soupravy vykazují zaměnitelnost se vzorky pacientů při použití činidel a pracovních postupů tohoto diagnostického testu in vitro podle doporučení výrobce.

3.4. Kontrolní sérum: lyofilizované činidlo

Lahvička obsahuje aldosteron, lidské sérum a konzervační látky. Rozmezí koncentrací každého kontrolního séra je uvedeno na osvědčení o analýze a představuje limity stanovené společností DiaSorin pro hodnoty kontrolních sér, které lze získat pomocí spolehlivých stanovení.

Rekonstituuje obsah lahvičky přidáním 1 ml destilované vody. Výsledný roztok je při 2 - 8 °C stabilní jeden týden, nebo může být skladován delší dobu rozdělený na poměrné díly a hluboce zmrazený (při teplotě -20 °C nebo nižší).

4. POTŘEBNÝ MATERIÁL A VYBAVENÍ, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- Laboratorní činidla (HCl, kyselina boritá) pro stanovení v moči.
- Laboratorní sklo.
- Jednorázové skleněné zkumavky.
- Stojan na zkumavky.

- Mikropipety s jednorázovými špičkami (10, 200, 500 µl) (10 µl: správnost ± 3 %, přesnost 2 %; 200, 500 µl: správnost ± 2 %, přesnost 1 %).
- Třepačka typu Vortex.
- Termostatem řízená vodní lázeň nebo ohřívací blok se schopností udržet teplotu 37 °C ± 1 °C.
- Zařízení k odsátí inkubační směsi.
- Gama-čítač vhodný pro počítání impulzů ¹²⁵I (nastavení okna čítače: 15-80 keV – účinnost čítače: 70 % – detekční čas: 1 min.) Je-li účinnost čítače nižší než 60 %, detekční čas je nutno prodloužit na 2 min.

5. ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKŮ

Důrazně se doporučuje pečlivá standardizace přípravy pacienta a podmínek odběru.

Vzorky séra nebo plazmy

S tímto stanovením byly testovány a jako antikoagulační látky mohou být používány draselná sůl EDTA a lithná sůl heparinu (viz odst. 9.1). Krev je nutné odebrat asepticky ze žíly, nechat ji koagulovat a poté co nejdříve oddělit sérum od sraženiny. U vzorků, které obsahují pevné částice, jsou zakalené, lipemické nebo obsahují zbytky erytrocytů, může být před provedením testu nutné čištění filtrací nebo centrifugací. Vysoce hemolyzované nebo lipemické vzorky a vzorky, které obsahují pevné částice nebo zjevnou mikrobiální kontaminaci, nelze pro stanovení použít. Je-li stanovení provedeno do 24 hodin od odběru vzorků, je nutné vzorky uchovávat při teplotě 2 - 8 °C; jinak je nutné vzorky rozdělit na poměrné díly a uchovávat hluboce zmrazené (při teplotě -20 °C nebo nižší). Pokud jsou vzorky uchovávány zmrazené, před provedením testu rozmražené vzorky dobře promíchejte. Zabraňte opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorků.

Jsou-li očekávány hladiny aldosteronu vyšší než 1000 pg/ml, je nutné vzorky zředit nulovým kalibračním roztokem.

Vzorky moči

Převezměte moč sbíranou za 24 hodin, změřte a zaznamenejte její objem. Před odebráním alikvotní části pro stanovení ji důkladně promíchejte. Přidejte 1 g kyseliny borité/100 ml roztoku a uložte při 2 - 8 °C na jeden den, nebo, má-li být vzorek skladován delší dobu, rozdělte na poměrné díly a hluboce zmrazte (při teplotě -20 °C nebo nižší).

Hydrolyza moči

Aldosteron může být stanoven ve vzorcích moči po kyselé hydrolyze aldosteron-18-glukuronidu. Za podmínek doporučených pro stanovení je hydrolyza úplná.

- **Smíchejte 100 µl moči a 1 ml 0,1N HCl.** Použijte skleněné zkumavky.
- Uzavřete zkumavky víčkem a **inkubujte přes noc** (po dobu 18 - 22 hodin) **při teplotě 30 ± 2 °C.**

6. POSTUP STANOVENÍ

Před stanovením vyteperujte všechna činidla na pokojovou teplotu (20 - 25 °C). Stanovení provádějte alespoň ve dvou paralelách. S každou sérií vzorků pacientů musí být stanoveny i kalibrační roztoky. Kalibrační roztoky a vzorky se musí zpracovat stejným postupem a se stejnou dobou inkubace.

Provedte všechny kroky analýzy v uvedeném pořadí bez nezanedbatelných prodlev mezi jednotlivými kroky.

K dávkování každého kalibračního roztoku a vzorku se musí použít čistá pipetová špička na jedno použití.

- Činidla dávkujte *na dno zkumavek s nanesenou vrstvou*. Pracujte podle následujícího schématu:

Činidla \ Zkumavky	Kalibrační roztok nuly	Kalibrační roztoky 1 - 5	Vzorky séra	Vzorky moči
Kalibrační roztok nuly	200 µl	–	–	200 µl
Kalibrační roztoky 1 - 5	–	200 µl	–	–
Vzorky séra	–	–	200 µl	–
Vzorky moči	–	–	–	10 µl*
Značená látka	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl

- * *U vzorků moči, u kterých se předpokládají nízké hladiny aldosteronu, je nutno použít 20 µl hydrolyzované moči.*
- Obsah zkumavek **promíchejte** na třepače typu Vortex a **inkubujte přes noc** (18 - 22 hodin) **při pokojové teplotě.**
- Pečlivě **odsajte** inkubační roztok. Špička odsávačky se musí dotýkat dna zkumavky s nanesenou vrstvou, aby se odsála veškerá kapalina. Pokud dostatečně neodsajete ulpěný roztok, může se snížit reprodukovatelnost a výsledky mohou být zkreslené. Nesmí být viditelná žádná stopa barviva.

- **Změřte radioaktivitu** zkumavek.

7. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Vypočítejte střední čisté počty impulzů pro každou skupinu zkumavek. Vypočítejte poměr B/Bo pro každý kalibrační roztok a pro každý neznámý vzorek podle následujícího vzorce:

$$B/Bo\% = \frac{\text{střední počty impulzů kalibračního roztoku nebo vzorku}}{\text{střední počty impulzů pro nulový kalibrační roztok}} \times 100$$

Do semilogaritmické nebo lineární-lineární souřadnicové sítě vyneste střední procentuální hodnotu pro každý kalibrační roztok na osu y jako funkci koncentrace aldosteronu vyjádřené v pg/ml nebo nmol/l na ose x. Takto získáte kalibrační křivku (obr. 1).

Vzorky séra nebo plazmy

Přímo z kalibrační křivky odečtete koncentraci aldosteronu v každém vzorku, vyjádřenou jako pg/ml or nmol/l. Byl-li vzorek naředěn, musí být koncentrace aldosteronu získaná pro naředěný vzorek vynásobena faktorem ředění.

Vzorky moči

Denní vylučování aldosteronu vyjádřené jako μg nebo nmol/24 hodin se vypočte následujícím postupem.

- *Pro objem 10 μl vzorku hydrolyzované moči*

Pro získání koncentrace aldosteronu v moči vyjádřené v pg/ml nebo nmol/l vynásobte hodnotu odečtenou z kalibrační křivky koeficientem 220. Koeficient 220 je odvozen z faktoru ředění hydrolyzované moči (11) vynásobením poměrem množství kalibračního roztoku k množství vzorku (20).

- *Pro objem 20 μl vzorku hydrolyzované moči*

Pro získání koncentrace aldosteronu v moči vyjádřené v pg/ml nebo nmol/l vynásobte hodnotu odečtenou z kalibrační křivky koeficientem 110. Koeficient 110 je odvozen z faktoru ředění hydrolyzované moči (11) vynásobením poměrem množství kalibračního roztoku k množství vzorku (10).

Pro získání koncentrace denně vyloučeného aldosteronu vynásobte hodnotu koncentrace aldosteronu objemem vyloučené moči (vyjádřeným v ml) podle následujícího vzorce.

$$\mu\text{g}/24 \text{ hodin} = \text{pg/ml} \times \text{ml vyloučené moči} \times 10^{-6}$$

$$\text{nmol}/24 \text{ hodin} = \text{nmol/l} \times \text{ml vyloučené moči} \times 10^{-3}$$

Příklad výpočtu

Následující data je nutno považovat pouze za příklad a nesmí se použít náhradou za data získaná uživatelem.

Popis	Počet impulsů za minutu (cpm)	B/Bo x 100
Kalibrační roztok nuly	10.220	100
50 pg/ml – 0,138 nmol/l	8.534	83,5
100 pg/ml – 0,277 nmol/l	7.409	72,5
250 pg/ml – 0,692 nmol/l	5.243	51,3
500 pg/ml – 1,385 nmol/l	3.352	32,8
1.000 pg/ml – 2,770 nmol/l	1.942	19,0
Vzorek séra	6.805	66,8
Vzorek moči	8.262	81,0

Vzorek séra

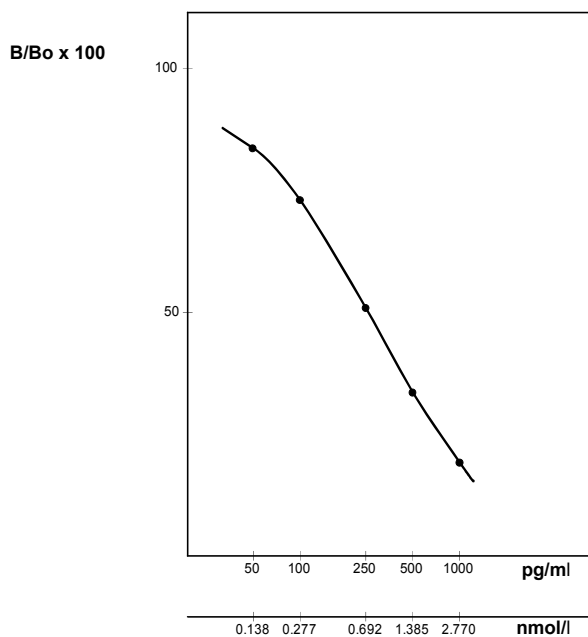
Interpolací z kalibrační křivky bylo zjištěno, že vzorek obsahuje 140 pg/ml (0,388 nmol/l) aldosteronu.

Vzorek moči

Interpolací z kalibrační křivky bylo zjištěno, že vzorek obsahuje 70 pg/ml (0,194 nmol/l) aldosteronu. Vezmeme-li v úvahu faktor 220 a objem moči vyloučené za 24 hodin (tj. 1 100 ml), je denní produkce vyloučeného aldosteronu vypočtena následujícím způsobem:

$$\mu\text{g}/24 \text{ hodin} = 70 \times 220 \times 1100 \times 10^{-6} = 15400 \times 1100 \times 10^{-6} = 16,94$$

$$\text{nmol}/24 \text{ hodin} = 0,194 \times 220 \times 1100 \times 10^{-3} = 42,68 \times 1100 \times 10^{-3} = 46,95$$



ALDOSTERON

Obr. 1

8. PŘEDPOKLÁDANÉ HODNOTY

Níže uvedená rozmezí jsou pouze orientační pro normální populaci s příjmem sodíku 100-150 mEq/24 hodin: každá laboratoř si musí stanovit svá vlastní referenční rozmezí.

Normální subjekty	PLAZMA, pg/ml	MOČ, $\mu\text{g}/24 \text{ hodin}$
Vleže na zádech	7,5 – 150	2,8 – 30,0
Vstoje	35 – 300	

Převod na nmol aldosteronu/l lze provést podle následujícího vzorce:

$$\text{nmol aldosteronu/l} = \text{pg aldosteronu/ml} \times 2,77 \times 10^{-3}$$

9. SPECIFICKÉ CHARAKTERISTIKY POSTUPU

9.1. Analytická specifčnost

Analytickou specifčnost lze definovat jako schopnost stanovení přesně detekovat konkrétní analyzovanou látku za přítomnosti potenciálně rušících faktorů v matrici vzorku (např. antikoagulačních činidel, hemolýzy, vlivů přípravy vzorku) nebo zkříženě reagujících analytů.

Rušení. Kontrolované studie potenciálně rušících látek nebo podmínek ukázaly, že provedení testu neovlivňuje vliv lipémie (až do 500 mg/dl triglyceridů) a bilirubinémie (až do 20 mg/dl bilirubinu). Hodnoty aldosteronu stanovené ve vzorcích obsahujících 200 mg/dl hemoglobinu jsou o cca 10 % vyšší než hodnoty stanovené v normálních vzorcích.

Při provedení studie rušení protisrážlivými látkami byly odpovídající vzorky séra a plazmy (vzorky plazmy získané pomocí lithné soli heparinu a draselné soli EDTA) odebrány 41 zdravým dobrovolníkům. Všechny vzorky byly testovány standardní metodou a byly pozorovány následující výsledky.

#	Vzorek	Sérum	Heparin	EDTA
41	Střední hodnota (pg/ml)	181,6 (100 %)	183,9 (101,3 %)	197,1 (108,5 %)

Výsledky těchto testů ukázaly, že hodnoty aldosteronu stanovené ve vzorcích plazmy obsahujících draselnou sůl EDTA byly o cca 10 % vyšší než hodnoty stanovené v séru nebo ve vzorcích plazmy s lithnou solí heparinu.

Zkřížené reakce. Procento zkřížených reakcí, vypočítané podle Abrahama, ukazuje specifčnost použitého antiséra.

- Aldosteron	100 %
- 3beta, 5 alfa-tetrahydroaldosteron	4,2 %
- 3alfa, 5 beta-tetrahydroaldosteron	0,3 %
- Kortexolon	$6,4 \times 10^{-3}$ %
- 18-OH-deoxykortikosteron	$5,0 \times 10^{-3}$ %
- Kortikosteron	$4,0 \times 10^{-3}$ %
- Kortizon	$2,5 \times 10^{-3}$ %
- Deoxykortikosteron	$1,0 \times 10^{-3}$ %
- Testosteron	$8,0 \times 10^{-4}$ %
- Prednisolon	$6,4 \times 10^{-4}$ %
- Kortizol	$1,0 \times 10^{-4}$ %
- Progesteron	$8,0 \times 10^{-5}$ %
- Spironolakton	$6,5 \times 10^{-5}$ %
- Dehydroepiandrosteron	$6,0 \times 10^{-5}$ %
- Pregnenolon	$5,0 \times 10^{-5}$ %
- Pregnantriol	$3,3 \times 10^{-5}$ %
- Dexamethazon	$3,3 \times 10^{-5}$ %
- Estradiol	$1,0 \times 10^{-6}$ %

9.2. Analytická citlivost

Analytická citlivost může být také vyjádřena jako detekční limit, což je minimální množství specifického analytu detekovatelného stanovením. Detekční limit je 10 pg/ml (0,0275 nmol/l) při 95% spolehlivosti. Tato hodnota byla vypočítána jako zjevná koncentrace analytu rozlišitelná od nulového kalibračního roztoku, tj. dvojnásobek standardní odchylky od nuly.

9.3 Přesnost

Byly analyzovány různé skupiny vzorků obsahujících různé koncentrace specifického analytu s cílem určit opakovatelnost a reprodukovatelnost stanovení (tj. variabilitu v rámci stanovení a mezi stanoveními).

Opakovatelnost	A	B	C
Počet stanovení	10	10	10
Střední hodnota (pg/ml)	86,4	249,9	495,6
Směrodatná odchylka	4,60	9,50	8,60
Variační koeficient (%)	5,3	3,8	1,7

Reprodukovatelnost	A	B	C
Počet stanovení	15	15	15
Střední hodnota (pg/ml)	91,3	230,3	607,5
Směrodatná odchylka	5,72	7,90	26,40
Variační koeficient (%)	7,0	3,4	4,3

9.4. Pravdivost

Pravdivost stanovení byla ověřena pomocí testu ředěním a testu výtěžnosti.

Test ředěním. Byla testována dvě séra s vysokou koncentrací aldosteronu po sériovém ředění nulovým kalibračním roztokem.

Ředění	Předpokládaná koncentrace, pg/ml	Naměřená koncentrace, pg/ml	% výtěžnosti
Neředěné	–	706,0	–
1:2	353,0	360,5	102,1
1:4	176,5	167,7	95,0
1:8	88,3	92,7	105,0
1:16	44,1	43,0	97,5
Neředěné	–	355,0	–
1:2	177,5	165,0	93,0
1:4	88,8	92,7	104,5
1:8	44,4	46,0	103,7
1:16	22,2	25,7	115,8

Test výtěžnosti. Byla testována dvě séra obsahující aldosteron, a to neředěná a po smíchání se zvyšujícím se množstvím aldosteronu.

Přidaná koncentrace, pg/ml	Předpokládaná koncentrace, pg/ml	Naměřená koncentrace, pg/ml	% výtěžnosti
–	–	147,0	–
520	659,7	713,0	108,1
300	439,7	469,0	106,7
180	319,7	305,0	95,4
40	179,7	177,0	98,5
–	–	291,0	–
520	796,5	815,0	102,3
300	576,5	573,0	99,4
180	456,5	435,0	95,3
40	316,5	321,0	101,4

10. OMEZENÍ POSTUPU

Klinická významnost stanovení aldosteronu je neplatná, jestliže subjekty nejsou v kontrolovaných podmínkách příjmu sodíku a draslíku a v kontrolovaných podmínkách zaujímané polohy, nebo jestliže jim jsou podány léky (například diuretika, klonidin, betablokátory, reserpin, alfa-methyl dopa atd.).

Diagnóza by neměla být stanovena na základě výsledku jednoho testu, ale musí být stanovena v součinnosti s klinickým nálezem a dalšími diagnostickými postupy a také podle lékařského úsudku.

Na výsledky stanovení může mít vliv bakteriální kontaminace nebo opakované zmrazení a rozmrazení vzorků.

Pro získání spolehlivých výsledků je nutné zvládnutí techniky a přísné dodržování návodu. Obzvláště důležité je zejména přesné pipetování a správné odsávání.

Sníženou reprodukovatelnost výsledků mohou způsobit metodologické faktory, zejména:

- záměna víček zkumavek,
- použití stejné špičky při odběrech z různých lahvíček nebo pro dávkování různých vzorků,
- ponechání zkumavek dlouhodobě otevřených,
- vystavení činidel nebo vzorků působení intenzivního tepla nebo zdrojům silné bakteriální kontaminace,
- nedostatečné odsávání inkubačního roztoku,
- kontaminace okrajů zkumavek značenou látkou nebo vzorky,
- příležitostná oscilace čítače gama záření nebo nesprávná manipulace s ním,
- použití činidel z různých hlavních šarží.

11. VAROVÁNÍ A ZVLÁŠTNÍ OPATŘENÍ

Všechny jednotky séra a plazmy, použité k výrobě složek dodaných v této soupravě, byly testovány na HBsAg, anti-HCV a anti-HIV-1/2 a shledány nereaktivními. Protože však žádná testovací metoda nemůže poskytnout absolutní jistotu nepřítomnosti patogenů, všechny vzorky lidského původu se musí považovat za potenciálně infekční a musí se s nimi zacházet opatrně.

12. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- V laboratoři, kde probíhá stanovení, nejezte, nepijte, nekuřte ani si nenanášejte kosmetické prostředky.
- Nepipetujte roztoky ústy.
- Používáním ochranných oděvů a pomůcek, jako jsou laboratorní pláště, ochranné brýle a rukavice na jedno použití, zabraňte kontaktu se všemi potenciálně infekčními materiály. Po provedení každého stanovení si důkladně umyjte ruce.
- Zabraňte rozstříknutí nebo vytvoření aerosolu. Dojde-li k rozlití činidla, je nutné činidlo vždy opláchnout 5% roztokem chlornanu sodného a zlikvidovat je, jako by bylo potenciálně infekční.
- Všechny vzorky, biologická činidla a materiály použité během stanovení musejí být považovány za materiál, který může potenciálně přenášet infekční agens. Proto je nutné likvidovat je v souladu s platnými předpisy a pokyny úřadů, do jejichž působnosti laboratoř spadá, a právními předpisy příslušné země. Materiál na jedno použití musí být spálen; tekutý odpad musí být dekontaminován působením chlornanu sodného v konečné koncentraci 5 %, a to nejméně po dobu půl hodiny. Veškerý materiál určený pro opakované použití musí být sterilizován v autoklávu při vyšších parametrech, než jsou nutné pro plnou sterilizaci (USP 24, 2000, str. 2143). Za postačující se obvykle považuje sterilizace po dobu 1 hodiny při 121 °C, i když uživatelé musejí kontrolovat účinnost svého dekontaminačního cyklu tak, že provedou počáteční validaci a pravidelně budou používat biologické indikátory.

13. ZÁKLADNÍ PRAVIDLA RADIAČNÍ BEZPEČNOSTI

Činidla obsahující jód 125

Tato souprava obsahuje radioaktivní materiál, jehož množství nepřevyšuje 2,17 μCi (81 kBq) jódu 125. Při uskladnění tohoto materiálu, manipulaci s ním a jeho likvidaci se musí dodržovat příslušná opatření a zásady správné laboratorní praxe.

Pro lékaře a instituce přijímající radioizotopy v rámci obecné licence:

Tento radioaktivní materiál mohou obdržet, nabývat, vlastnit a používat pouze lékaři, veterináři, kteří vykonávají veterinární praxi, klinické laboratoře nebo nemocnice, a to pouze pro účely klinických nebo laboratorních testů in vitro, při nichž není materiál ani záření, jež z něj vychází, aplikováno vnitřně ani externě lidem ani zvířatům. Jeho obdržení, nabytí, držení, užívání a přeprava podléhá předpisům a obecné licenci Komise pro dohled nad jadernou bezpečností USA (U.S. Nuclear Regulatory Commission) nebo státu, s nímž komise uzavřela dohodu o výkonu regulační pravomoci.

1. Skladování radioaktivního materiálu se musí omezovat pouze na určený prostor.
2. Přístup k radioaktivnímu materiálu smí mít pouze oprávněný personál.
3. Radioaktivní materiál nepipetujte ústy.
4. Při práci v prostorech určených k práci s radioaktivním materiálem nejezte, nepijte ani nekuřte.
5. V případě rozlití je nutno materiál setřít, potom omýt alkalickým detergentem nebo roztokem k radiologické dekontaminaci. Veškeré použité sklo musí být nejdříve důkladně opláchnuto vodou a teprve poté může být umyto s jiným laboratorním sklem.

Pro lékaře a instituce přijímající radioizotopy v rámci specifické licence:

přijetí, použití, transport a likvidace radioaktivních materiálů podléhá předpisům a podmínkám specifické licence.

POZOR: Hodnoty radioaktivity uvedené na příbalové informaci v balení se mohou mírně lišit od hodnot uvedených na štítku krabice a na štítku lahvičky se značenou látkou. Štítky na krabici a na lahvičce se značenou sloučeninou označují skutečné množství radioaktivity k datu kalibrace; příbalová informace v balení uvádí teoretickou radioaktivitu soupravy.

SCHÉMA ANALÝZY

- 1 - VZORKY SÉRA NEBO PLAZMY ANALYZUJTE PŘÍMO.
VZORKY MOČI HYDROLYZUJTE PŮSOBENÍM 0,1N HCl PŘES NOC PŘI 30 °C.
- 2 - REKONSTITUJTE ČINIDLA. OZNAČTE PARALELNÍ ZKUMAVKY S NANESENOU VRSTVOU.
- 3 - PODLE NÁSLEDUJÍCÍHO SCHÉMATU NADÁVKUJTE ČINIDLA A PROMÍCHEJTE INKUBAČNÍ SMĚS:

ZKUMAVKY ČINIDLA	0 KAL	KAL 1-5	VZORKY SÉRA	VZORKY MOČI
KALIBRAČNÍ ROZTOK NULY	200 µl	–	–	200 µl
KALIBRAČNÍ ROZTOKY 1 - 5	–	200 µl	–	–
VZORKY SÉRA	–	–	200 µl	–
VZORKY MOČI	–	–	–	10 µl*
ZNAČENÁ LÁTKA	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl

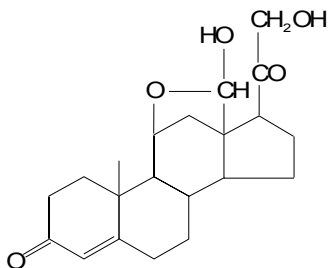
- 4 - INKUBUJTE PŘES NOC PŘI POKOJOVÉ TEPLOTĚ.
- 5 - ODSAJTE REAKČNÍ SMĚS.
- 6 - ZMĚŘTE RADIOAKTIVITU ZKUMAVEK.

* 20 µl v případě nízkých hladin aldosteronu.

ΚΙΤ ΓΙΑ ΤΗΝ ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΔΟΣΤΕΡΟΝΗΣ
Μέθοδος για την ποσοτική ανάλυση της αλδοστερόνης σε δείγματα ορού,
πλάσματος, ή ούρων ανθρώπινης προέλευσης
Μόνο για χρήση *in vitro*

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αλδοστερόνη είναι μια στεροειδής ορμόνη μοριακού βάρους 360,4 dalton, με τον ακόλουθο χημικό τύπο:



Η αλδοστερόνη εκκρίνεται από την σπειραματική περιοχή του φλοιού των επινεφριδίων. Είναι με διαφορά ο πιο ισχυρός ρυθμιστής της απέκκρισης ηλεκτρολυτών στα ούρα.

Η αλδοστερόνη δημιουργεί δεσμό με ειδικούς ορμονικούς υποδοχείς στα ανάλογα νεφρικά κύτταρα όπου πιθανότατα προάγει τη σύνθεση αγγελιοφόρου RNA με συνεπάγουσα δημιουργία νέας πρωτεΐνης. Ο ρόλος αυτής της πρωτεΐνης είναι αμφιλεγόμενος, αλλά πιστεύεται ότι διευκολύνει την είσοδο του νατρίου στα κύτταρα φορείς ή ότι παρέχει σε αυτά τα κύτταρα μια μεγαλύτερη ενέργεια για την ενεργή μεταφορά νατρίου. Και στις δύο περιπτώσεις το αποτέλεσμα της εκδηλώνεται με μία αύξηση της μεταφοράς νατρίου (επαναρρόφηση).

Στον περιφερικό νεφρώνα, η δράση της αλδοστερόνης εκδηλώνεται με μια αύξηση της επαναρρόφησης ιόντων νατρίου και χλωρίου από το νεφρικό σωληνάριο και με μια αύξηση της αποβολής ιόντων καλίου και υδρογόνου στο νεφρικό σωληνάριο. Η επαναρρόφηση ιόντων νατρίου και χλωρίου τείνει να αυξάνει την οσμωγραμμομοριακότητα του εξωκυτταρικού υγρού. Η αύξηση της εξωκυτταρικής οσμωγραμμομοριακότητας διεγείρει την έκκριση ADH και η ADH με τη σειρά της διευκολύνει την κατακράτηση νερού από μέρος του νεφρού. Ιόντα νατρίου, χλωρίου και νερό γενικά κατακρατούνται ή απεκκρίνονται μαζί: για το λόγο αυτό μπορεί κανείς να πει ότι η αλδοστερόνη διεγείρει, έμμεσα, την επαναρρόφηση νερού σε επίπεδο νεφρικών σωληναρίων.

Ο μηχανισμός που ρυθμίζει την έκκριση αλδοστερόνης αποκρίνεται στις μεταβολές της ενυδάτωσης του σώματος. Το σύστημα νεφρίνης-αγγειοτονίνης είναι ο κύριος μεσολαβητής της ενυδάτωσης του σώματος. Οι καταστάσεις που προκαλούν τη μείωση του όγκου του εξωκυτταρικού υγρού όπως επίσης και εκείνες που προκύπτουν στην κατακράτηση του φλεβικού αίματος τείνουν να διεγείρουν την παραγωγή νεφρίνης και επομένως εκείνη της αγγειοτονίνης. Η αγγειοτονίνη δρα άμεσα στο αγγειακό σύστημα ως παράγοντας πίεσης και εκτός αυτού διεγείρει την έκκριση αλδοστερόνης από το φλοιό των επινεφριδίων.

Η έκκριση αλδοστερόνης επηρεάζεται άμεσα και από:

1. Μεταβολές της συγκέντρωσης καλίου στο πλάσμα ή στους ιστούς: Η υποκαλιαιμία καταστέλει, ενώ η υπερκαλιαιμία διεγείρει την έκκριση αλδοστερόνης.
2. Έκκριση ACTH.
3. Μεταβολές της συγκέντρωσης νατρίου στο πλάσμα ή στους ιστούς: Η υπονατριαιμία διεγείρει, ενώ η υπερνατριαιμία καταστέλει την έκκριση αλδοστερόνης.

Η δοσομέτρηση της αλδοστερόνης μπορεί να εκτελεστεί στο πλάσμα ή στον ορό και στα ούρα 24 ωρών.

Έχοντας υπόψη τον ταχύ καταβολικό ρυθμό της αλδοστερόνης, η δοσομέτρησή της στο πλάσμα είναι πολύ χρήσιμη στην αξιολόγηση των οξείων μεταβολών (νυχθημερής ρυθμός, μεταβολές θέσεως, διεγέρσεις και καταστολές μικρής χρονικής διάρκειας). Από κλινικής πλευράς χρειάζεται να υπογραμμιστεί όμως ότι οι τιμές της αλδοστερόνης στο πλάσμα αντικατοπτρίζουν μόνο τη συνθήκη σε μια δεδομένη στιγμή της ημέρας. Από τη στιγμή που η έκκριση της αλδοστερόνης στο πλάσμα έχει μια άμεση πορεία που ακολουθεί ένα νυχθημερή ρυθμό, μπορεί να μην είναι έγκυρα τα συμπεράσματα που θα βγούν από ένα και μόνο προσδιορισμό. Ο προσδιορισμός της αλδοστερόνης στα ούρα 24 ωρών αντικατοπτρίζει συνολικά την ημερήσια εκκριτική κατάσταση, ενώ ο προσδιορισμός της αλδοστερόνης του πλάσματος είναι καταλληλότερος για στοχοθετημένες μελέτες.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗΣ

Η αρχή της δοσομέτρησης συνίσταται στον ανταγωνισμό ανάμεσα στην ιχνηθετημένη αλδοστερόνη και στην αλδοστερόνη που περιέχεται στους βαθμονομητές ή στα δείγματα για το σταθερό και περιορισμένο αριθμό θέσεων των αντισωμάτων. Έπειτα από την επώαση, η ποσότητα της ιχνηθετημένης αλδοστερόνης που έχει δημιουργήσει δεσμό με το συνδεδεμένο αντίσωμα στους ευαισθητοποιημένους δοκιμαστικούς σωλήνες είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της μη ιχνηθετημένης αλδοστερόνης που υπάρχει στους βαθμονομητές ή στα δείγματα. Η μέθοδος που υιοθετείται για το διαχωρισμό ελεύθερης/συνδεδεμένης βασίζεται στη χρήση των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων, όπου το αντίσωμα έχει συνδεθεί στα τοιχώματα των δοκιμαστικών σωλήνων.

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΚΙΤ

Ευαισθητοποιημένοι δοκιμαστικοί σωλήνες	100
Αλδοστερόνη ιχνηθετημένη με ¹²⁵ I	1 φιαλίδιο
Βαθμονομητές αλδοστερόνης	6 φιαλίδια
Ορός ελέγχου	1 φιαλίδιο
Αριθμός δοσομετρήσεων	100

ΤΡΟΠΟΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ: Κατά τη στιγμή της άφιξης, διατηρήστε τα κιτ στους 2-8°C. Μην καταψύχετε. Έπειτα από το άνοιγμα, τα αντιδραστήρια αυτού του κιτ είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξεως εάν διατηρηθούν καταλλήλως. Το κιτ είναι εγγυημένο για 2 αναλυτικές σειρές εάν τα αντιδραστήρια διατηρούνται σύμφωνα με όσα συσιστώνται από τον κατασκευαστή.

Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια πέραν της ημερομηνίας λήξεως. Η ημερομηνία λήξεως του κιτ φαίνεται στην εξωτερική ετικέτα και ανταποκρίνεται στην ημερομηνία λήξεως του ιχνηθέτη. Η ημερομηνία λήξεως καθενός συστατικού φέρεται στις ετικέτες των αντίστοιχων φιαλιδίων.

Κατά την ανασύσταση των φιαλιδίων, ανακινήστε απαλά ώστε να αποφύγετε τη δημιουργία αφρού. Μην αναμιγνύετε αντιδραστήρια που προέρχονται από διαφορετικές παρτίδες.

3.1. Ευαισθητοποιημένοι δοκιμαστικοί σωλήνες

Η εσωτερική επιφάνεια κάθε δοκιμαστικού σωλήνα έχει επενδυθεί με αντιορό αντι-αλδοστερόνης κουνελιού. Τη στιγμή της χρήσης, φέρατε τους ευαισθητοποιημένους δοκιμαστικούς σωλήνες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν να ανοίξετε το δοχείο, ώστε να αποφύγετε συμπύκνωση της υγρασίας. Οι αχρησιμοποίητοι δοκιμαστικοί σωλήνες πρέπει να διατηρούνται στο καλά κλειστό δοχείο. Μην αναμιγνύετε διαφορετικές παρτίδες ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων.

3.2. Αλδοστερόνη ιχνηθετημένη με ¹²⁵I (κόκκινο): αντιδραστήριο έτοιμο προς χρήση

Το φιαλίδιο περιέχει 52 mL ιχνηθετημένης αλδοστερόνης με ¹²⁵I, ανθρώπινο ορό χωρίς στεροειδή, φωσφορικό ρυθμιστικό, συντηρητικά και μια αδρανή κόκκινη χρωστική. Η μέγιστη ραδιενέργεια είναι 85 kBq (2,3 μCi) κατά την ημερομηνία της βαθμονόμησης.

3.3. Βαθμονομητές αλδοστερόνης

Κάθε φιαλίδιο περιέχει αυξανόμενες ποσότητες αλδοστερόνης, ανθρώπινο ορό χωρίς στεροειδή και συντηρητικά. Ο όγκος του βαθμονομητή μηδέν είναι 3 mL.

Πραγματοποιήστε ανασύσταση του περιεχομένου των βαθμονομητών 1-5 με 1 mL απεσταγμένου νερού. Τα διαλύματα που προκύπτουν θα περιέχουν αντιστοίχως 50 - 100 - 250 - 500 - 1000 pg/mL (0,138 - 0,277 - 0,692 - 1,385 - 2,770 nMol/L) και είναι σταθερά για μία εβδομάδα στους 2-8°C ή διαιρεμένα σε κλάσματα στους -20°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες για μια πιο μακρά συντήρηση.

Από τη στιγμή που δεν είναι διαθέσιμο επί του παρόντος ένα διεθνές πρότυπο, οι βαθμονομητές του κιτ έχουν βαθμονομηθεί έναντι ενός εσωτερικού παρασκευάσματος αναφοράς (καθαρό στο 99% σε HPLC). Οι έλεγχοι του κιτ εναλλάσσονται με τα δείγματα υπό εξέταση όταν χρησιμοποιούνται με τα αντιδραστήρια και την επιχειρησιακή διαδικασία του αντίστοιχου διαγνωστικού τεστ *in vitro*, σύμφωνα με όσα συσιστώνται από τον κατασκευαστή.

3.4. Ορός ελέγχου: λυόφιλο αντιδραστήριο

Το φιαλίδιο περιέχει αλδοστερόνη, ανθρώπινο ορό και συντηρητικά. Το εύρος των συγκεντρώσεων κάθε ελέγχου αναφέρεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης και δείχνει τα όρια που έχουν καθοριστεί από την DiaSorin για τιμές ελέγχων που μπορούν να επιτευχθούν σε αξιόπιστους κύκλους εξετάσεων.

Πραγματοποιήστε ανασύσταση του περιεχομένου του φιαλιδίου με 1 mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα που προκύπτει είναι σταθερό για μία εβδομάδα στους 2-8°C ή διαιρεμένο σε κλάσματα στους -20°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες για μια πιο μακρά συντήρηση.

4. ΒΟΗΘΗΤΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Απεσταγμένο και αποϊονισμένο νερό.
- Αντιδραστήρια εργαστηρίου για τη δοσομέτρηση ούρων (HCl, βορικό οξύ).
- Γυάλινα είδη εργαστηρίου.
- Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες μίας χρήσεως.
- Έδρανα δοκιμαστικών σωλήνων.
- Μικρομετρικές σύριγγες με άκρα μίας χρήσεως των 10 μL (ακρίβεια ± 3%, ακρίβεια 2%) και 200, 500 μL (ακρίβεια ± 2%, επαναληπτικότητα 1%).
- Αναδευτήρας Vortex.
- Θερμοστατικό σύστημα σε θέση να διατηρεί 37° ± 1°C.
- Σύστημα για την αναρρόφηση του μίγματος επώασης.
- Μετρητής γάμμα για τη μέτρηση του Ιωδίου ¹²⁵I (ρύθμιση παραμέτρων του παραθύρου του μετρητή: 15-80 keV - απόδοση του μετρητή: 70% - χρόνος μέτρησης: 1 min). Εάν η απόδοση του μετρητή είναι κατώτερη του 60%, πρέπει να παραταθεί ο χρόνος μέτρησης σε 2 min.

5. ΑΝΑΛΗΨΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Συνίσταται να τυποποιήσετε επιμελώς την προπαρασκευή του ασθενούς και τις συνθήκες ανάληψης του δείγματος.

Δείγματα ορού ή πλάσματος

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντιπηκτικά όπως λίθιο, ηπαρίνη και EDTA (βλέπε §9.1). Πραγματοποιήστε την αιμοληψία από φλέβα, αφήστε το αίμα να πήξει και διαχωρήστε τον ορό από το θρόμβο το συντομότερο δυνατόν. Καθαρίστε με φιλτράρισμα ή φυγοκέντριση πριν από το τεστ τα δείγματα που παρουσιάζουν υλικό σε αιώρηση, λευκαύγεια, λιπαιμία ή ερυθροκυτταρικά υπόλοιπα. Μη χρησιμοποιείτε δείγματα που έχουν υποστεί ισχυρή αιμόλυση ή λιπαιμικά, ούτε επίσης και δείγματα που παρουσιάζουν υλικό σε αιώρηση ή προφανή μόλυνση από μικρόβια. Εάν η δοσομέτρηση έχει εκτελεσθεί στις επόμενες 24 ώρες από την αιμοληψία, τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους 2-8°C. Σε αντίθετη περίπτωση, πρέπει να διαιρεθούν σε κατεψυγμένα κλάσματα στους -20°C ή σε κατώτερες θερμοκρασίες. Εάν τα δείγματα έχουν κατεψυχθεί, ανακινήστε με προσοχή πριν να τα δοσομετρήσετε. Αποφεύγετε επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης και απόψυξης.

Εάν προβλέπονται επίπεδα αλδοστερόνης υψηλότερα από 1000 pg/mL, αραιώστε με τον βαθμονομητή μηδέν.

Δείγματα ούρων

Συλλέξτε τα ούρα των 24 ωρών και μετρήστε τον όγκο τους. Αναμίξτε επιμελώς πριν να πραγματοποιήσετε την ανάληψη του κλάσματος για την ανάλυση. Προσθέστε βορικό οξύ (1 g/100 mL ούρων) και διατηρήστε στους 2-8°C εάν η δοσομέτρηση πραγματοποιείται στις 24 ώρες ή διαφορετικά καταψύξτε σε κλάσματα στους -20°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες για μεγαλύτερες χρονικές περιόδους.

Υδρόλυση των ούρων

Η αλδοστερόνη μπορεί να δοσομετρηθεί στα δείγματα ούρων έπειτα από όξινη υδρόλυση της 18-γλυκουρονικής αλδοστερόνης. Στις συνιστώμενες συνθήκες η υδρόλυση είναι πλήρης.

- Προσθέστε σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες **100 μL ούρων** και **1 mL HCl 0,1 N**.
- Πωματίστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες και αφήστε για επώαση για **18-22 ώρες σε 30 ± 2°C**.

6. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Φέρατε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20-25°C) πριν από τη δοσομέτρηση. Προβλέπετε τους προσδιορισμούς τουλάχιστον διπλά. Εκτελέστε τον προσδιορισμό των βαθμονομητών για κάθε σειρά αναλυμένων δειγμάτων. Η επιχειρησιακή μέθοδος πρέπει να είναι αυστηρά όμοια για τους βαθμονομητές και για τα δείγματα υπό εξέταση.

Εκτελέστε τις φάσεις της δοσομέτρησης με την προβλεπόμενη σειρά, χωρίς διακοπές.

Χρησιμοποιήστε μια νέα άκρη μίας χρήσεως για να απαλλάξετε τους βαθμονομητές και τα δείγματα.

- Διανήμειτε τα αντιδραστήρια στον πυθμένα των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων. Ενεργήστε σύμφωνα με το ακόλουθο σχεδιάγραμμα:

δοκιμαστικοί σωλήνες	Βαθμονομητής μηδέν	Βαθμονομητές 1-5.	Δείγματα (ορός)	Δείγματα (υδρολυμένα ούρα)
αντιδραστήρια				
Βαθμονομητής μηδέν	200 µL	–	–	200 µL
Βαθμονομητές 1-5	–	200 µL	–	–
Δείγματα (ορός)	–	–	200 µL	–
Δείγματα (υδρολυμένα ούρα)	–	–	–	10 µL*
Ιχνηθέτης	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL

* Για τα δείγματα ούρων με χαμηλό επίπεδο αλδοστερόνης, σας συμβουλεύουμε να χρησιμοποιήσετε έναν όγκο 20 µL υδρολυμένων ούρων.

- **Ανακινήστε** το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων σε αναδευτήρα Vortex και
- **αφήστε για επώαση για 18-22 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.**
- **Αναρροφήστε** επιμελώς το μίγμα επώασης. *Βεβαιωθείτε ότι η αποβολή του υγρού είναι πλήρης, όντας σίγουροι ότι η άκρη της μικροσύριγγας αναρρόφησης ακουμπά στον πυθμένα των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων. Η παρουσία σταγόνων που εφάπτονται στα τοιχώματα των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων μπορεί να προκαλέσει μειωμένη αναπαραγωγιμότητα ή μη έμπιστα αποτελέσματα. Δεν πρέπει να μείνει ίχνος της χρωστικής.*
- **Μετρήστε τη ραδιενέργεια** των δοκιμαστικών σωλήνων.

7. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπολογίστε το μέσο όρο των μετρήσεων για κάθε ομάδα δοκιμαστικών σωλήνων αφού έχετε αφαιρέσει την τιμή του ιζήματος. Εκφράστε το μέσο όρο των μετρήσεων βαθμονομητών και δειγμάτων ως εκατοστιαίο σε σχέση με το βαθμονομητή μηδέν:

$$B/B_0\% = \frac{\text{μέση μέτρηση βαθμονομητών και δειγμάτων}}{\text{μέση μέτρηση βαθμονομητή μηδέν}} \times 100$$

Φέρατε σε γραφικό διάγραμμα semilog ή γραμμικό-γραμμικό τον εκατοστιαίο μέσο όρο που υπολογίστηκε για κάθε βαθμονομητή στον άξονα των τεταγμένων (άξονας των Y) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση της αλδοστερόνης εκφρασμένη σε pg/mL ή nmol/L στο άξονα των τεταγμένων (άξονας των X). Επιτυγχάνεται έτσι μια καμπύλη βαθμονόμησης (Εικόνα 1).

Δείγματα ορού ή πλάσματος

Διαβάστε απευθείας από την καμπύλη βαθμονόμησης τη συγκέντρωση αλδοστερόνης κάθε δείγματος εκφρασμένη σε pg/mL ή nmol/L. Εάν το δείγμα έχει αραιωθεί, η συγκέντρωση αλδοστερόνης που έχει βρεθεί πρέπει να πολλαπλασιαστεί με τον παράγοντα αραιώσης.

Δείγματα ούρων

Ο υπολογισμός της ημερήσιας έκκρισης αλδοστερόνης εκφρασμένη σε μg ή $\text{nmol}/24$ ώρες εκτελείται ακολουθώντας την ακόλουθη μέθοδο.

- Για ένα δείγμα υδρολυμένων ούρων όγκου 10 μL . Πολλαπλασιάστε την αναγνωσμένη τιμή από την καμπύλη βαθμονόμησης επί 220, έτσι ώστε να επιτύχετε την συγκέντρωση αλδοστερόνης στα ούρα σε pg/mL ή σε nmol/L . Ο συντελεστής 220 προέρχεται από τον παράγοντα αραιώσης της υδρολυμένης αλδοστερόνης (11), πολλαπλασιάζοντας επί την αναλογία βαθμονομητής/δείγμα (20).
- Για ένα δείγμα υδρολυμένων ούρων όγκου 20 μL . Πολλαπλασιάστε την αναγνωσμένη τιμή από την καμπύλη βαθμονόμησης επί 110, έτσι ώστε να επιτύχετε την συγκέντρωση αλδοστερόνης στα ούρα σε pg/mL ή σε nmol/L . Ο συντελεστής 110 προέρχεται από τον παράγοντα αραιώσης της υδρολυμένης αλδοστερόνης (11), πολλαπλασιάζοντας επί την αναλογία βαθμονομητής/δείγμα (10).
- Για να επιτύχετε τη συγκέντρωση της ημερήσιας έκκρισης αλδοστερόνης, πολλαπλασιάστε τη συγκέντρωση της αλδοστερόνης επί τον όγκο των εκκριμένων ούρων (εκφρασμένο σε mL) σύμφωνα με τους ακόλουθους τύπους:

$$\mu\text{g}/24 \text{ ώρες} = \text{pg}/\text{mL} \times \text{mL} \text{ εκκριμένων ούρων} \times 10^{-6}$$

$$\text{nmol}/24 \text{ ώρες} = \text{pg}/\text{mL} \times \text{mL} \text{ εκκριμένων ούρων} \times 10^{-3}$$

Παράδειγμα υπολογισμού

Τα ακόλουθα στοιχεία πρέπει να θεωρηθούν μόνο ένα παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν ανάμεσα στα στοιχεία που θα προκύψουν στο χρήστη.

Περιγραφή	cpm	B/Bo x 100
Βαθμονομητής μηδέν	10.220	100
50 pg/mL - 0,138 nmol/L	8.534	83,5
100 pg/mL - 0,277 nmol/L	7.409	72,5
250 pg/mL - 0,692 nmol/L	5.243	51,3
500 pg/mL - 1,385 nmol/L	3.352	32,8
1.000 pg/mL - 2,770 nmol/L	1.942	19,0
Δείγμα (ορός)	6.805	66,8
Δείγμα (ούρα)	8.262	81,0

Δείγμα ορού

Παρεμβάλλοντας από την καμπύλη βαθμονόμησης, το δείγμα προκύπτει να περιέχει 140 pg/mL (0,388 nmol/L) αλδοστερόνης.

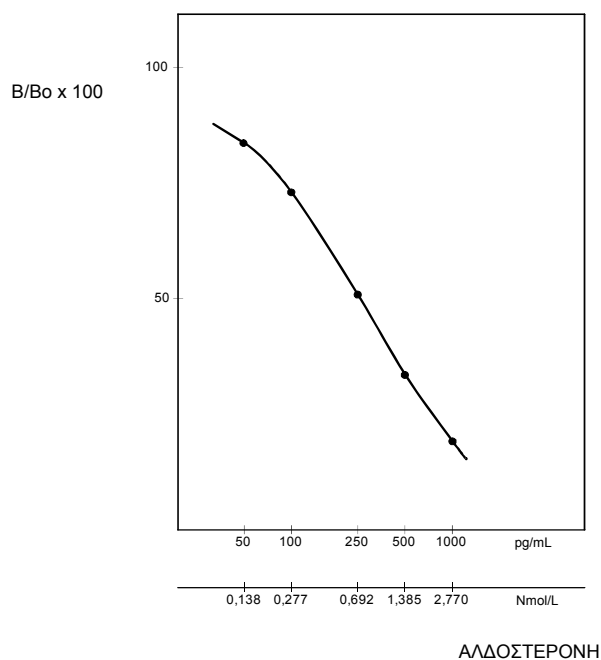
Δείγμα ούρων

Παρεμβάλλοντας από την καμπύλη βαθμονόμησης, το δείγμα προκύπτει να περιέχει 70 pg/mL (0,194 nmol/L) αλδοστερόνης.

Έχοντας υπόψη το συντελεστή 220 και το συνολικό όγκο ούρων που συλλέχθηκε στις 24 ώρες (παράδειγμα 1100 mL), η ημερήσια έκκριση αλδοστερόνης υπολογίζεται με τον ακόλουθο τρόπο:

$$\mu\text{g}/24 \text{ ώρες} = 70 \times 220 \times 1100 \times 10^{-6} = 15400 \times 1100 \times 10^{-6} = 16,94$$

$$\text{nmol}/24 \text{ ώρες} = 0,194 \times 220 \times 1100 \times 10^{-3} = 42,68 \times 1100 \times 10^{-3} = 46,95$$



Εικόνα 1

8. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Εξετάζοντας ένα πληθυσμό φυσιολογικών ατόμων με εισφορά νατρίου 100-150 mEq/24 ώρες, επιτυγχάθηκαν τα ακόλουθα διαστήματα. Συνιστούμε σε κάθε εργαστήριο να προσδιορίσει τα δικά του διαστήματα αναφοράς.

Φυσιολογικά άτομα	ΠΛΑΣΜΑ, pg/mL	ΟΥΡΑ, μg/24 ώρες
Ύππια θέση	7,5 - 150	2,8 - 30,0
Όρθια θέση	35 - 300	

Η μετατροπή σε nmol αλδοστερόνης/L εκτελείται με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{nmol αλδοστερόνης/L} = \text{pg αλδοστερόνης/mL} \times 2,77 \times 10^{-3}$$

9. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΟΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΙΤ

9.1. Ειδικότητα ανάλυσης

Η αναλυτική ειδικότητα ορίζεται σαν η ικανότητα του τεστ να ανιχνεύει ακριβώς τον αναλύτη παρουσία παραγόντων δυνητικά παρεμβαλλόντων στο στέλεχος του δείγματος (για παράδειγμα, αντιπηκτικά, αιμόλυση, αποτελέσματα της επεξεργασίας του δείγματος) ή διασταυρούμενες αντιδράσεις με αναλύτες δυνητικώς παρεμβαλλόντες.

Παρεμβολές. Μελέτες που έχουν ελεγχθεί σχετικά με παράγοντες δυνητικώς παρεμβαλλόντες, έχουν αποδείξει το ότι οι επιδόσεις του τεστ δεν επηρεάζονται από λιπαιμία (μέχρι 500 mg/dL τριγλυκερίδια), χολερυθριναιμία (μέχρι 20 mg/dL χολερυθρίνης). Οι τιμές αλδοστερόνης που επιτυγχάνονται με δείγματα που περιέχουν 200 mg/dL αιμοσφαιρίνης είναι περίπου 10% ανώτερες από εκείνες που επιτυγχάνονται με φυσιολογικά δείγματα.

Στις μελέτες παρεμβολής των αντιπηκτικών αναλήφθηκαν δείγματα ορού και πλάσματος (που έχουν εξαχθεί με λίθιο ηπαρίνη και κάλιο EDTA) από 41 υγιείς εθελοντές. Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν με την μέθοδο standard, με τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Αρ.	Δείγμα	Ορός	Ηπαρίνη	EDTA
41	μέσος όρος (pg/mL)	181,6 (100%)	183,9 (101,3%)	197,1 (108,5%)

Τα αποτελέσματα αυτών των αναλύσεων αποδεικνύουν ότι οι τιμές αλδοστερόνης που επιτεύχθηκαν με τα δείγματα πλάσματος που περιείχαν κάλιο EDTA προέκυπταν περίπου 10% ανώτερες από εκείνες που επιτεύχθηκαν με τα δείγματα ορού ή πλάσματος που περιείχαν λίθιο ηπαρίνη.

Διασταυρούμενες αντιδράσεις. Τα εκατοστιαία ποσοστά διασταυρώμενων αντιδράσεων, που έχουν υπολογιστεί σύμφωνα με Abraham, επιδεικνύουν την ειδικότητα του χρησιμοποιούμενου αντιορού.

- Αλδοστερόνη	100%
- 3 βήτα, 5 άλφα τετραϋδροαλδοστερόνη	4.2%
- 3 άλφα, 5 βήτα τετραϋδροαλδοστερόνη	0.3%
- Cortexolon	$6.4 \times 10^{-3}\%$
- 18-OH-δεσοξυκορτικοστερόνη	$5.0 \times 10^{-3}\%$
- Κορτικοστερόνη	$4.0 \times 10^{-3}\%$
- Κορτικοειδή	$2.5 \times 10^{-3}\%$
- Δεσοξυκορτικοστερόνη	$1.0 \times 10^{-3}\%$
- Τεστοστερόνη	$8.0 \times 10^{-4}\%$
- Πρεδνιζόνη	$6.4 \times 10^{-4}\%$
- Κορτιζόλη	$1.0 \times 10^{-4}\%$
- Προγεστερόνη	$8.0 \times 10^{-5}\%$
- Spironolacton	$6.5 \times 10^{-5}\%$
- Διϋδροεπιανδροστερόνη	$6.0 \times 10^{-5}\%$
- Pregnenolon	$5.0 \times 10^{-5}\%$
- PTL	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Δεξαμεθαζόνη	$3.3 \times 10^{-5}\%$
- Οιστραδιόλη	$1.0 \times 10^{-6}\%$

9.2. Ευαισθησία ανάλυσης

Η αναλυτική ευαισθησία μπορεί να εκφρασθεί επίσης σας όριο ανίχνευσης, ή η ελάχιστη ποσότητα αναλύτη που είναι ανιχνεύσιμη από το τεστ. Το όριο ανίχνευσης είναι 10 pg/mL (0,0275 nmol/L) στο 95% εμπιστοσύνης. Έχει υπολογισθεί σαν η φαινομενική συγκέντρωση του αναλύτη που διακρίνεται από τον βαθμονομητή μηδέν, ή δύο τυπικές αποκλίσεις κάτω από το μηδέν.

9.3. Επαναληπτικότητα

Η επαναληπτικότητα και η αναπαραγωγικότητα του δείγματος (ή αλλιώς η δια-δειγματική και ενδο-δειγματική μεταβλητότητα) έχουν καθοριστεί χρησιμοποιώντας δείγματα αναφοράς υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις αναλύτη.

Επαναληπτικότητα	A	B	C
Αριθμός καθορισμών	10	10	10
Μέσος όρος (pg/mL)	86,4	249,9	495,6
Τυπική απόκλιση	4,60	9,50	8,60
Βαθμός μεταβολής (%)	5,3	3,8	1,7

Αναπαραγωγικότητα	A	B	C
Αριθμός καθορισμών	15	15	15
Μέσος όρος (pg/mL)	91,3	230,3	607,5
Τυπική απόκλιση	5,72	7,90	26,40
Βαθμός μεταβολής (%)	7,0	3,4	4,3

9.4. Ακρίβεια

Η ακρίβεια της δοσομέτρησης έχει ελεγχθεί μέσω τεστ αραιώσης και ανάκτησης.

Τεστ αραιώσης. Έχουν δοσομετρηθεί μονόμετρες αραιώσεις δύο ορών σε υψηλή συγκέντρωση αλδοστερόνης πραγματοποιημένες στο βαθμονομητή μηδέν.

Αραιώση	Αναμενόμενη συγκέντρωση, pg/mL	Μετρημένη συγκέντρωση, pg/mL	% Ανάκτησης
άθικτο	–	706,0	–
1:2	353,0	360,5	102,1
1:4	176,5	167,7	95,0
1:8	88,3	92,7	105,0
1:16	44,1	43,0	97,5
άθικτο	–	355,0	–
1:2	177,5	165,0	93,0
1:4	88,8	92,7	104,5
1:8	44,4	46,0	103,7
1:16	22,2	25,7	115,8

Τεστ ανάκτησης. Έχουν δοσομετρηθεί δύο οροί που περιέχουν αλδοστερόνη, τόσο άθικτοι όσο και αφού έχει προστεθεί αυξανόμενη ποσότητα αλδοστερόνης.

ροσιθέμενη συγκέντρωση pg/mL	Αναμενόμενη συγκέντρωση pg/mL	Μετρημένη συγκέντρωση, pg/mL	% Ανάκτησης
–	–	147,0	–
520	659,7	713,0	108,1
300	439,7	469,0	106,7
180	319,7	305,0	95,4
40	179,7	177,0	98,5
–	–	291,0	–
520	796,5	815,0	102,3
300	576,5	573,0	99,4
180	456,5	435,0	95,3
40	316,5	321,0	101,4

10. ΟΡΙΑ ΤΗΣ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗΣ

Η κλινική σημασία του προσδιορισμού των επιπέδων αλδοστερόνης μπορεί να ακυρωθεί εάν η ημερήσια λήψη νατρίου και καλίου ή η θέση του σώματος δεν βρίσκονται υπό έλεγχο, ή όταν γίνεται λήψη φαρμάκων όπως διουρητικά, κλονιδίνη, β- αναστολείς, ρεζερπίνη, άλφα-μεθυλδοπα, κτλ.

Η διάγνωση δεν θα πρέπει να διατυπώνεται με βάση το αποτέλεσμα μιας και μόνο δοσομέτρησης, αλλά αυτό θα πρέπει να αξιολογείται μαζί με άλλα κλινικά ευρήματα, διαγνωστικές διαδικασίες και υπό την κρίση του ιατρού.

Βακτηριακή μόλυνση ή επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ψύξης/απόψυξης των δειγμάτων μπορούν να μετατρέψουν τα αποτελέσματα της δοσομέτρησης.

Για να επιτευχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα χρειάζεται να ακολουθούνται πιστά οι οδηγίες χρήσεως και να κατέχεται μια κατάλληλη τεχνική χειρωναξία. Ειδικότερα, είναι ουσιώδης η ακρίβεια χειρισμού στην ανασύσταση, διανομή και αναρρόφηση των αντιδραστηρίων.

Αποτελέσματα που δεν επαναλαμβάνονται οφείλονται κυρίως σε μεθοδολογικούς παράγοντες όπως για παράδειγμα:

- εναλλαγή στις κάψουλες ανάμεσα στα φιαλίδια
- χρήση του ίδιου άκρου μικροσύριγγας για τις αναλήψεις από διαφορετικά φιαλίδια ή από διαφορετικά δείγματα.
- φιαλίδια που έχουν αφεθεί ανοικτά για μακρές χρονικές περιόδους
- έκθεση των αντιδραστηρίων ή των δειγμάτων σε έντονη θερμότητα, ή σε ισχυρές πηγές βακτηριακής μόλυνσης.
- ακατάλληλη αναρρόφηση του μίγματος επώασης
- μόλυνση του άκρου των δοκιμαστικών σωλήνων με τον ιχνηθέτη ή με τα δείγματα
- τυχαίες διακυμάνσεις ή κακή συντήρηση του μετρητή γάμμα
- εναλλαγή των αντιδραστηρίων από διαφορετικές παρτίδες.

11. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Όλες οι μονάδες ορού και πλάσματος που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των συστατικών αυτού του κιτ έχουν αναλυθεί και έχει βρεθεί ότι δεν έχουν καμία αντιδραστικότητα με HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 και anti-HIV-2. Παρ'όλα αυτά δεδομένου του ότι καμία μέθοδος δεν μπορεί να δώσει απόλυτη σιγουριά για το ότι απουσιάζουν παθογόνοι παράγοντες, όλο το υλικό ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να θεωρείται ως δυνητικώς μολυσματικό και επομένως θα πρέπει να τυχάνει κατάλληλης μεταχείρισης.

12. ΚΑΝΟΝΕΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

- Μην τρώτε, πίνετε, καπνίζετε ή χρησιμοποιείτε καλλυντικά κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της δοσομέτρησης.
- Μην πραγματοποιείτε αναρρόφηση με το στόμα.
- Αποφεύγετε την άμεση επαφή με τα υλικά που ενδεχομένως να είναι μολυσμένα, φορώντας κατάλληλη ένδυση εργαστηρίου, προστατευτικά γυαλιά και γάντια μίας χρήσεως. Πλένετε προσεκτικά τα χέρια στο τέλος της δοσομέτρησης.
- Αποφεύγετε να προκαλείτε πιτσιλίσματα ή αεροζόλ. Κάθε σταγόνα βιολογικού αντιδραστήριου πρέπει να αποβάλλεται με ένα διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5% και το χρησιμοποιούμενο μέσο θα πρέπει να τυχάνει μεταχείρισης κατάλληλης για μολυσμένα απόβλητα.
- Όλα τα δείγματα, όλα τα βιολογικά αντιδραστήρια του κιτ και όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση της δοσομέτρησης θα πρέπει να θεωρούνται ικανά να μεταδώσουν μολυσματικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό τα απόβλητα πρέπει να διατεθούν σύμφωνα με τις νομοθετικές διατάξεις και τους ισχύοντες κανονισμούς κάθε Κράτους. Τα υλικά μίας χρήσεως θα πρέπει να αποτεφρώνονται. Τα υγρά απόβλητα θα πρέπει να απολυμαίνονται με υποχλωριώδες νάτριο σε μία τελική συγκέντρωση της τάξεως του 5% για τουλάχιστον μισή ώρα. Οποιοδήποτε υλικό που πρέπει να επαναχρησιμοποιηθεί θα πρέπει να τίθεται σε κλίβανο με μια προσέγγιση *overkill* (USP 24, 2000, p. 2143). Γενικά θεωρείται ότι μία ώρα στους 121°C είναι ένας επαρκής χρόνος αποστείρωσης. Παρ'όλα αυτά συνιστούμε σε κάθε χρήστη να επιβεβαιώνεται σχετικά με την αποτελεσματικότητα του κύκλου απολύμανσης μέσω μιας αρχικής επικύρωσης και την χρήση,σε βάση ρουτίνας, βιολογικών δεικτών.

13. ΒΑΣΙΚΟΙ ΚΑΝΟΝΕΣ ΡΑΔΙΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

Αντιδραστήρια που περιέχουν ιώδιο 125

Το κιτ αυτό περιέχει ραδιενεργό υλικό το οποίο δεν υπερβαίνει τα 2,17 μCi (81 kBq) σε ιώδιο 125. Κατά τη φύλαξη, το χειρισμό και τη διάθεση του υλικού αυτού, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες προφυλάξεις και καλές εργαστηριακές πρακτικές.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από γενική άδεια:

Το παρόν ραδιενεργό υλικό μπορεί να ληφθεί, να αποκτηθεί, να κατέχεται και να χρησιμοποιείται μόνο από ιατρούς, κτηνίατρος που εξασκούν κτηνιατρική ιατρική, κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία και μόνο για κλινικές ή εργαστηριακές δοκιμές *in vitro* που δεν περιλαμβάνουν την εσωτερική ή εξωτερική χορήγηση του υλικού, ή της ακτινοβολίας αυτού, σε ανθρώπους και ζώα. Η παραλαβή, η απόκτηση, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά υπόκεινται στους κανονισμούς και τη γενική άδεια της Ρυθμιστικής Επιτροπής Πυρηνικών των Η.Π.Α. (NRC) της πολιτείας στην οποία η επιτροπή έχει συνάψει συμφωνία για την άσκηση καθηκόντων αρμόδιας αρχής.

1. Η φύλαξη του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να περιοριστεί σε ειδικά επισημασμένο χώρο.
2. Η πρόσβαση σε ραδιενεργά υλικά πρέπει να περιοριστεί μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό.
3. Μη χρησιμοποιείτε πιπέτα με το στόμα σε ραδιενεργά διαλύματα.
4. Μην τρώτε ή πίνετε εντός των χώρων εργασίας που έχουν επισημανθεί ως ραδιενεργοί.
5. Οι περιοχές, όπου ενδεχομένως έχουν προκληθεί εκχύσεις, θα πρέπει να σκουπιστούν και κατόπιν να πλυθούν με αλκαλικό απορρυπαντικό ή ραδιολογικό απολυμαντικό διάλυμα. Τυχόν υάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να εκπλυθούν καλά με νερό πριν από την πλύση άλλων εργαστηριακών υάλινων σκευών.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από ειδική άδεια:

Η παραλαβή, η χρήση, η μεταφορά και η διάθεση των ραδιενεργών υλικών υπόκεινται στους κανονισμούς και τις συνθήκες της ειδικής άδειάς σας.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Η ραδιενέργεια που αναγράφεται στο ένθετο συσκευασίας μπορεί να διαφέρει ελαφρώς από τη ραδιενέργεια που αναγράφεται στην ετικέτα συσκευασίας ή στην ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη. Η ετικέτα συσκευασίας και η ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη υποδεικνύουν την πραγματική ποσότητα ραδιενέργειας κατά την ημερομηνία βαθμονόμησης, ενώ το ένθετο συσκευασίας υποδεικνύει τη θεωρητική ραδιενέργεια του κιτ.

ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗΣ

- 1 - ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΤΕ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΡΟΥ Η ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ.
ΥΔΡΟΛΥΣΤΕ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ ΜΕ HCl 0,1 N ΓΙΑ 18-22 ΩΡΕΣ ΣΤΟΥΣ 30°C.
- 2 - ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΤΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ. ΣΗΜΕΙΩΣΤΕ ΔΙΠΛΑ ΤΟΥΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΟΥΣ ΣΩΛΗΝΕΣ.
- 3 - ΔΙΑΝΗΜΤΕ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟ ΑΚΟΛΟΥΘΟ ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΚΑΙ ΑΝΑΚΙΝΗΣΤΕ ΤΟ ΜΙΓΜΑ ΕΠΩΑΣΗΣ:

ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΟΙ ΣΩΛΗΝΕΣ	CAL 0	CAL 1-5	ΔΕΙΓΜΑΤΑ (ΟΡΟΣ)	ΔΕΙΓΜΑΤΑ (ΥΔΡΟΛΥΜΕ ΝΑ ΟΥΡΑ)
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ				
ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΗΣ ΜΗΔΕΝ	200 μL	-	-	200 μL
ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ 1-5	-	200 μL	-	-
ΔΕΙΓΜΑΤΑ (ΟΡΟΣ)	-	-	200 μL	-
ΔΕΙΓΜΑΤΑ (ΥΔΡΟΛΥΜΕΝΑ ΟΥΡΑ)	-	-	-	10 μL*
ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL

- 4 - ΑΦΗΣΤΕ ΓΙΑ ΕΠΩΑΣΗ ΓΙΑ 18-22 ΩΡΕΣ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ.
- 5 - ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΤΕ ΤΟ ΜΙΓΜΑ ΕΠΩΑΣΗΣ.
- 6 - ΜΕΤΡΗΣΤΕ ΤΗ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΩΝ ΣΩΛΗΝΩΝ.

* 20 μL για τα δείγματα με χαμηλά επίπεδα αλδοστερόνης

**REFERENCES/BIBLIOGRAFIA/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/REFERÊNCIAS/REFERENSER/
LITTERATUR/IRODALOM/SEZNAM LITERATURY/BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ**

G.E. ABRAHAM, R. GARZA, F.S. MANLIMOS

Radioimmunoassay of steroids.

In: «Handbook of radioimmunoassay», G.E. Abraham ed., M. Dekker Inc., New York, p. 591 (1977).

C.R. EDWARDS, J. LANDON

Corticosteroids.

In: «Hormone assays and their clinical application», J.A. Loraine, E.T. Bell eds., Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 519 (1976).

G.W. LIDDLE

The adrenals.

In: «Textbook of endocrinology», R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p. 249 (1981).

R. MALVANO et al.

Recent trends in methodological simplification of steroid radioimmunoassay.

Hormone Res., **9** : 422 (1978).

A. SALVETTI et al.

Clinical significance of renin and aldosterone.

SORIN Monograph of Immunology, no. 4 (1981).

G. WILLIAMS, R.H. UNDERWOOD

Mineral corticoids: aldosterone, deoxycorticosterone, 18-hydroxydeoxycorticosterone and 18-hydroxycorticosterone.

In: «Methods of hormone radioimmunoassay», B.M. Jaffe, H.R. Behrman eds., Academic Press, New York, p. 743 (1979).



DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.
Phone: 651-439-9710
FAX: 651-351-5669

APM0131



DiaSorin S.p.A.,
13040 Saluggia (VC) Italy

34673 7/10