

Aldosterone

CE

1. INTRODUCTION

L'aldostérone est une hormone stéroïdienne du cortex de la surrénale dans la glande adrénale et le minéralcorticoïde le plus diffus chez les êtres humains ; il régule l'équilibre du potassium et du sodium dans le sang. La sécrétion de l'aldostérone semble être régulée à travers le système rein-angiotensine. L'aldostérone agit sur les récepteurs des minéralcorticoïdes des cellules rénales en augmentant la perméabilité de la membrane apicale (lumière) au potassium et au sodium et il active les pompes Na⁺/K⁺ ; il stimule l'hydrolyse de l'ATP, la réabsorption de l'eau et du sodium dans le sang et l'excrétion du potassium dans les urines. L'aldostérone est impliquée dans la régulation de l'équilibre acide/base.

L'aldostérone est responsable de la réabsorption d'environ 2 % du sodium filtré dans les reins.

Les taux d'aldostérone dans le plasma varient normalement selon la position du corps (debout > couché). Les taux plasmatiques d'aldostérone présentent un rythme circadien semblable au cortisol avec des pics en matinée ; environ 75 % de la production quotidienne est sécrétée entre 04 :00 h et 10 :00 h chaque jour. Les taux tendent à diminuer avec l'âge.

Des concentrations élevées d'aldostérone dans le plasma se présentent par exemple en cas d'adénomes et hyperaldostéronisme et dans les idiopathies sensibles aux glucocorticoïdes.

Une sécrétion anormalement faible d'aldostérone se présente dans des cas comme l'hyperplasie adrénale congénitale, la néphropathie et les acidoses tubulaires rénales.

2. INDICATION D'UTILISATION

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition pour la détermination quantitative d'Aldosterone dans le sérum ou le plasma humain.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

L'Aldosterone (antigène) présent dans l'échantillon rentre en compétition avec l'Aldosterone antigénique marqué à la peroxydase de raifort (HRP, Conjugué) par rapport à l'anticorps anti-Aldosterone adsorbé sur la microplaque (phase solide). Après de la incubation, la séparation libre-lié est obtenue par simple lavage de la phase solide. Après, l'enzyme HRP présent dans la fraction liée catalyse la réaction entre le substrat (H₂O₂) et le substrat TMB (TMB), en développant une coloration bleue qui vire au jaune après ajout de la solution d'arrêt (H₂SO₄).

L'intensité de la couleur développée est inversement proportionnelle à la concentration d'Aldosterone dans l'échantillon. Un lecteur de microplaques ELISA permet la lecture de l'absorption à 450 nm.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'Anti-Aldosterone** : 12 bandes détachables enduites d'Anti-Aldosterone de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop** : 1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, 0.15 mol/l (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué Aldosterone-HRP** : 1 flacon contenant 15 mL mL d'Aldosterone marqué à la peroxydase de raifort.
- **Solution de TMB** : 1 flacon contenant 15 mL de H₂O₂-TMB 0.26g/l, (éviter tout contact avec la peau).
- **Solution de lavage (concentrée x 10)** : 1 flacon contenant 50 mL 0.2M tampon phosphate pH 7,4
- **Contrôle d'Aldosterone A** : 1 flacon contenant 1 mL d'un lot spécifique d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Contrôle d'Aldosterone B** : 1 flacon contenant 1 mL d'un lot spécifique d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Etalons Aldosterone** : 6 flacons, 1 mL chacun

Etalon 0:	0 pg/mL
Etalon 1:	20 pg/mL
Etalon 2:	80 pg/mL
Etalon 3:	300 pg/mL
Etalon 4:	800 pg/mL
Etalon 5:	2000 pg/mL

4.2. Matériels fournis

- 1 support de plaque
- 1 jeu de feuilles de recouvrement
- 1 mode d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériels et équipements requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm, 620-630 nm
- Incubateur 37 °C
- Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits
- Pipettes
- Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre 2 °C et 8 °C à l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (22 °C – 28 °C) pendant au moins 30 minutes avant de commencer le dosage ! À la fin de l'essai conserver les réactifs immédiatement à 2-8 °C ; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Bandes détachables enduites

Les bandes détachables sont enduites d'anticorps d'anti Aldosterone et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre 2 °C et 8 °C. N'ouvrir l'emballage que si la pièce est à température ambiante. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre 2 °C et 8 °C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

6.2. Conjugué Aldosterone-HRP

Le conjugué est prêt à l'emploi.

6.3. Etalons Aldosterone

Mélanger 5 minutes avant utilisation avec un vortex. Les étalons sont prêts à l'emploi.

Après la première utilisation les contrôles restent stables pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à 2 – 8 °C.

6.4. Contrôles

Les flacons contiennent 1 mL d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.

6.5. Solution TMB

Le flacon contient 15 mL d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé 2 °C et 8 °C à l'obscurité. *La solution doit être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être remplacé.*

6.6. Solution stop

Le flacon contient 15 mL d'une solution d'acide sulfurique 0.15 mol/l. Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée entre 2 °C et 8 °C.

6.7. Solution de lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée 10x avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 mL avant utilisation. Pour les petits volumes respecter le rapport de dilution de 1 :10. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2 °C et 8 °C.

Dans une solution de lavage concentrée, il est possible d'observer la présence de cristaux; dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à dissolution complète des cristaux; pour une plus grande précision, diluez la totalité de la bouteille de solution de lavage concentrée à 500 mL en prenant soin de transférer également les cristaux, puis mélangez jusqu'à dissolution complète des cristaux.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons de sérum ou de plasma humain pour ce dosage.

- échantillons de sérum:

Les tubes SST («Serum Separation Tube») peuvent être utilisés pour obtenir du sérum sans aucune interférence avec le dosage.

- échantillons de plasma:

Les échantillons de plasma peuvent être obtenus avec l'EDTA, l'héparine de Litium et l'héparine de sodium sans aucune interférence avec le dosage.

Si le dosage est effectué le jour même du prélèvement, les échantillons doivent être conservés entre 2 °C à 8 °C ; sinon ils doivent être aliquotés et congelés (-20 °C). Si les échantillons sont congelés, bien mélanger les échantillons congelés avant le dosage. *Eviter les répétitions de congélation décongélation.*

Échantillons avec une concentration plus élevée que 2000 pg/mL ne doivent pas être dilués; ces échantillons doivent être signalés comme "> 2000 pg/mL".

8. PROCEDE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'emploi **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans le kit, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et les placer sur le support. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter toutes dérives du dosage. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse. Réserver au moins :

1 puits	(ex. A1)	Pour le blanc
2 puits	(ex. B1+C1)	Pour l'étalon 0
2 puits	(ex. D1+E1)	Pour l'étalon 1
2 puits	(ex. F1+G1)	Pour l'étalon 2
2 puits	(ex. H1+A2)	Pour l'étalon 3
2 puits	(ex. B2+C2)	Pour l'étalon 4
2 puits	(ex. D2+E2)	Pour l'étalon 5
2 puits	(ex. F2+G2)	Pour le contrôle A
2 puits	(ex. H2+A3)	Pour le contrôle B

Il est recommandé de déterminer les étalons, les contrôles et les échantillons du patient en doublets.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque étalons et échantillon.

Régler l'incubateur à 37 °C.

1. Pipeter 50 µL d'étalons, de contrôles et d'échantillons dans leurs puits respectifs. Ajouter 100 µL de conjugué dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
2. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.

3. **Incuber pendant 1 heure à 37 °C.**
4. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µL de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction.

Note importante : Pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

Équipement automatisé : Si vous utilisez l'équipement automatisé, lavez les puits au moins 5 fois.

Note : *L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.*

5. Pipeter 100 µL de solution de TMB dans tous les puits.
6. **Incuber pendant exactement 20 min à température ambiante (22 – 28 °C) à l'obscurité.**
7. Pipeter 100 µL de solution stop dans tous les puits dans le même ordre à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque.
La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
8. Mesurer l'absorbance (E) des échantillons à 450 nm contre e blanc –contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le blanc au cours de 5 minutes.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc dans le puits A1.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets, si nécessaires.**

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

Calculer l'absorbance moyenne pour chaque point du courbe étalon et de chaque échantillon. Tracer la valeur d'absorbance moyenne des étalons par rapport à la concentration. Dessiner le meilleur ajustement de la courbe sur les points tracés (4 paramètres logistiques).

Interpoler les valeurs des échantillons sur le courbe étalon pour obtenir les valeurs de concentrations correspondantes en pg/mL.

9.2. Valeurs de Référence

Pour déterminer la plage normale pour les échantillons de sérum / plasma, des échantillons de plasma EDTA de 150 hommes et femmes apparemment en bonne santé ont été testés. La posture des patients, qu'ils soient debout ou couchés avant la collecte de l'échantillon, est inconnue.

Résultat:

Plage normale du sérum / plasma
<14,6 - 174 pg / mL

Veillez noter que la détermination d'une plage de valeurs attendues pour une population «normale» dans une méthode donnée dépend de nombreux facteurs, tels que la spécificité et la sensibilité de la méthode utilisée et du type de population sous enquête. Par conséquent, chaque laboratoire doit considérer la plage indiquée par le fabricant comme une indication générale et produire sa propre plage de valeurs attendues en fonction de la population autochtone dans laquelle le laboratoire fonctionne.

10. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire doit faire des contrôles de dosage à des niveaux de gammes normales, élevées et faibles d'Aldosterone pour surveiller la performance des dosages. Ces contrôles doivent être considérés comme inconnus et les valeurs doivent être déterminés dans chaque test effectué. Les chartes de contrôles qualité doivent être maintenues pour suivre les performances des réactifs fournis. Des méthodes de statistiques pertinentes doivent être employées pour établir des tendances. Le laboratoire individuel doit établir des limites de performance de dosage acceptables. De plus, l'absorbance maximale doit être dans la même ligne que les expériences passées. Les déviations significatives provenant des performances établies peuvent indiquer un changement non remarquable dans les conditions expérimentales ou dans la dégradation des réactifs du kit. Les réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer la raison des variations.

11. PERFORMANCE ET CARACTERISTIQUES

11.1. Sensibilité Analytique

La sensibilité analytique a été étudiée à travers les méthodes LOB (Limite of Blank), LOD (Limite de détection), LOQ (Limite de quantification) et Sensibilité Analytique (A.S.).

Le tableau ci-dessous présente les critères de l'étude et les résultats obtenus:

	Critères	Résultats (pg / mL)
LOB	60 répliques de Cal 0, utilisé comme "blanc", ont été étudiées au cours de 9 sessions différentes sur 5 jours	15,3
LOD	6 échantillons de faible sérum ont été analysés dans 10 sessions différentes sur 5 jours	41,5
LOQ	6 échantillons de faible sérum ont été analysés dans 10 sessions différentes sur 5 jours	79,1

A.S.	20 réplicats de Cal 0 et 5 réplicats de Cal 2 ont été analysés. A.S. a été calculé par régression linéaire. 14,6	14,6
------	---	------

11.2. Précision et Reproductibilité (Précision Complexe)

Pour déterminer la précision et la reproductibilité, 5 échantillons de sérum différents ont été utilisés.

Le tableau ci-dessous présente les pourcentages « Within Run » et Total CV.

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

11.3. L'étude de type d'échantillon

L'étude de type d'échantillon a été évaluée en effectuant le test en parallèle avec le sérum et le plasma appartenant au même sujet.

20 sujets différents ont été utilisés.

Le sérum obtenu avec des tubes SST et le plasma obtenu avec de l'EDTA, de l'héparine de lithium et de l'héparine de sodium ont été étudiés.

L'interférence a été jugée "significative" si elle provoque un biais de concentration > 10% entre l'échantillon et la référence (plasma EDTA).

Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus :

Echantillon	Bias	Interférence
Plasma EDTA	référence	/
Sérum	9,1%	non
Sérum (tubes SST)	6,4%	non
Plasma Lithium héparine	5,1%	non
Plasma Sodium héparine	7,6%	non

Conclusion: après l'étude, les échantillons de sérum et de plasma peuvent être utilisés indifféremment avec ce kit.

11.4. Spécificité analytique

11.4.1. Substances interférentes

L'interférence de la bilirubine conjuguée, de l'hémoglobine et des triglycérides a été étudiée en ajoutant la substance interférente à l'échantillon de sérum et en comparant sa concentration à celle de l'échantillon non dopé.

Des échantillons contenant des concentrations faibles et élevées d'aldostérone ont été analysés.

L'interférence a été jugée "significative" si elle provoque une concentration (biais) > 10% entre les échantillons enrichis et non enrichis.

Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus:

Substance	Conc. dosée	Interférence
Triglycérides	600 mg/dL	Non
Bilirubiné, conjuguée	33,1 mg/dL	Non
Hémoglobine	6,6 mg/dL	Non

Conclusion: à la suite de l'étude, il n'y a pas d'interférence significative de la bilirubine conjuguée, de l'hémoglobine et des triglycérides à la concentration dosée.

11.4.2. Réaction Croisée

Les réactifs croisés suivants ont été enrichis dans des échantillons de sérum avec concentration faible et élevée d'aldostérone. Les échantillons faibles et élevés respectifs non piqués ont été utilisés comme référence.

L'interférence a été jugée "significative" si elle provoque un biais de concentration > 10% entre les échantillons enrichis et non enrichis.

Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus:

Réactif Croisé	Conc. dosée	Interférence
Corticostérone	0,1 µg/mL	Non
L'androstérone	5 µg/mL	Non
Cortisone	0,1 µg/mL	Non
Diidrotestostérone (DHT)	0,5 µg/mL	Non
Estradiol	10 µg/mL	Non
Estrone	10 µg/mL	Non
Estriol	10 µg/mL	Non
Testostérone	0,2 µg/mL	Non
DHEA-S	10 µg/mL	Non

11.5. Exactitude

11.5.1. Linéarité

Trois tests ont été effectués avec 3 paires de sérum (avec une concentration faible et élevée en aldostérone); 11 dilutions couvrant la plage basse à haute ont été analysées.

Le dosage est linéaire sur la plage analysée (environ 85,8 à 1520,9 pg / mL).

11.5.2. Récupération

Trois tests ont été réalisés avec 3 échantillons de sérum à faible concentration en aldostérone, chacun enrichi avec le Cal 5 en différents pourcentages.

La récupération moyenne dans les trois échantillons a été de 109%, 102% et 111%.%

11.6. Corrélation

126 échantillons de plasma EDTA ont été testés avec le kit NovaTec Aldostérone ELISA et avec le test IDS-iSYS Aldostérone (méthode de référence).

La courbe de régression linéaire est la suivante:

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

$$r^2 = 0,94$$

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir la pertinence, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Le matériel d'origine animale utilisé dans la préparation du kit a été obtenu à partir d'animaux certifiés en bonne santé et la protéine bovine a été obtenue de pays non infectés par l'ESB, mais ces matériels doivent être manipulés comme potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Quand l'utilisation a automatisé l'équipement, l'utilisateur a la responsabilité de s'assurer que le kit a été convenablement évalué.
- Si le liquide n'est pas complètement extrait des puits, cela peut influencer la précision du dosage et/ou augmenter le bruit de fond. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- Les réactifs contiennent de la Procline 300® en tant que conservateur
- Le TMB est irritant, ce qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Eviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau et les yeux pour prévenir de ces risques.
- La solution stop est une solution d'acide sulfurique diluée. L'aide sulfurique est un poison corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Eviter tout contact avec la peau ou les yeux pour prévenir des brûlures chimiques.
- L'addition de la solution de substrat initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être faite durant la manipulation pour éliminer tous risques de dépassement de la durée de réaction.
- Cette méthode permet la détermination d'Aldosterone entre 41,5 pg/mL (LOD) – 2000 pg/mL.
- Suivre la notice pour les contrôles qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et/ou les sérums.
- Les échantillons microbiologiquement contaminés ne doivent pas être utilisés pour le dosage. Les échantillons hautement lipémiques ou hémolysés ne doivent pas être utilisés non plus.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.
- La méthode ELISA de NovaTec est destinée à un personnel qualifié qui est familiarisé avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

AVERTISSEMENT : Aux concentrations utilisées, la Proclin 300® n'a que très peu de risque toxicologique s'il y a contact avec la peau ou les muqueuses !

12.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Prod. No.:

DNOV012

Aldosterone (96 Dosages)