



RENIN-IRMA

KIP1531

Read entire protocol before use.

RENIN-IRMA

I. INTENDED USE

Immunoradiometric assay kit for the in vitro quantitative determination of active Renin in human EDTA plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name :** DIAsource Renin-IRMA Kit
- B. Catalog number :** KIP1531 : 96 tests
- C. Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CLINICAL BACKGROUND

Renin , a polypeptidic enzyme (MW~ 40000) (1) also known as angiotensinogenase, is a circulating protease secreted by juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus of the kidneys in response to low blood volume or low body NaCL content.

Renin activates the renin-angiotensin system by cleaving angiotensinogen produced in the liver into angiotensin I (inactive) which is further converted into angiotensin II (active) in the vascular epithelium of the lung. Angiotensin II can cause vasoconstriction by stimulating the central nervous system , in addition it stimulates ADH (antidiuretic hormone) secretion and aldosterone secretion from the adrenal gland .(6)

Regulation of blood pressure and renal glomerular filtration control (2) are the most important functions of renin -angiotensin system .

Plasmatic concentration of renin is influenced by concentration of circulating angiotensinogen and subsequently the concentration of angiotensin II. High plasmatic levels of angiotensin II reduce renin secretion.(negative feed back)

Determination of renin plasma levels is useful in the diagnosis of hypertension and in the therapeutic follow up of hypertensive patients (3).

Plasmatic concentration of renin decreases in patients with hypertension due to a primary hyperaldosteronism (4), contrary to renovascular hypertension (5) where concentrations of renin and aldosterone are both elevated.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIAsource Renin-IRMA is an immunoradiometric assay based on coated-tube. Mab1, the capture antibody, is attached to the lower and inner surface of the plastic tube. Calibrators or samples added to the tubes will at first show low affinity for Mab1. Addition of Mab2, the signal antibody labelled with ¹²⁵I, will complete the system and trigger the immunological reaction. After washing, the remaining radioactivity bound to the tube reflects the antigen concentration.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution			
 Tubes coated with anti Renin (monoclonal antibody)	2 x 48	black	Ready for use			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Anti-Renin ¹²⁵ I (monoclonal antibody) in Phosphate buffer with bovine serum, azide (<0.1%)	Ab	¹²⁵ I	1 vial 10.5 ml 760 kBq	red	Ready for use	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrators 0-6 in human serum and thymol. See exact value on vial labels.	CAL	N	7 vials lyophilised	yellow	Add 2 ml distilled water	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash solution (Tween 20-NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 40 ml	green	Dilute 20 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls - N = 1 or 2 in human serum and thymol	CONTROL	N	2 vials lyophilised	silver	Add 2 ml distilled water	
CONTROL	N					

Note: 1. Use the zero calibrator for sample dilution.
2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 2.2 +/- 0.2 µIU of NIBSC 68/356.
Values obtained in pg/ml must be multiplied by 2.2 to obtain results in µIU/ml or mIU/L.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 100 µl, 300 µl, and 2 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Plastic tubes for total counts
4. Vortex mixer
5. Tube shaker (400 rpm)
6. Magnetic stirrer
7. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
8. Aspiration system (optional)
9. Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- A. Calibrators:** Reconstitute the calibrators with 2 ml distilled water . **! For a complete solubilisation : after reconstitution, let the vials 15 min on a shaker, then vortex them.**
- B. Controls:** Reconstitute the controls with 2 ml distilled water .
- C. Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 19 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (20x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, the calibrators and controls are unstable, use them immediately after reconstitution, freeze them immediately in aliquots and keep them at -20°C for maximum 6 weeks. They are stable after 1 freeze-thaw cycle .
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Samples must be EDTA plasma.
- If the test is not run within 4 h., plasma should be aliquoted and stored at -20°C.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

X. PROCEDURE

- A. Handling notes**
Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
Respect the incubation times.
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

- B. Procedure**
1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample and control. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
 2. Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 300 µl of each into the respective tubes.
 3. Dispense 100 µl of ¹²⁵Iodine labelled anti Renin into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
 4. Incubate for 180 minutes at room temperature on a tube shaker (400 rpm).
 5. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
 6. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
 7. Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
 8. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
 9. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. On log-log , semi logarithmic or linear graph paper plot the c.p.m. (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of Renin (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points, reject the obvious outliers.
3. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
4. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is to be used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

Renin-IRMA			cpm	B/T (%)
Total count				100
Calibrator	0 pg/ml	0 µIU/ml	152	
	4 pg/ml	8.8 µIU/ml	579	0.14
	9 pg/ml	19.8 µIU/ml	984	0.27
	47 pg/ml	103.4 µIU/ml	3826	1.18
	95 pg/ml	209 µIU/ml	8161	2.58
	250 pg/ml	550 µIU/ml	20851	6.67
	520 pg/ml	1144 µIU/ml	55190	17.73

1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 2.2 +/- 0.2 µIU of NIBSC 68/356

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twelve zero calibrators were assayed along with a set of the other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration of the average count at zero binding plus two standard deviations, was 0.78 pg/ml

B. Specificity

The Cross-reactivity of Prorenin in this Renin IRMA assay was determined by adding various concentrations of Prorenin to a plasma matrix and by measuring the apparent Renin response. Prorenin Cross-reactivity was found to be 0.3 %.

The potentially interfering effects of hemoglobin at 7.5 mg/ml and of bilirubin at 0.2 mg/ml have been evaluated. The results of this test (see the table below) show a decrease of approximatively 10% of plasma values. The recommendation is to avoid hemolized samples and bilirubin containing samples.

Sample tested	Renin value (pg/ml)	+ Human Hb at 7.5 mg/ml (pg/ml)
1.	21.2	18.5
2.	57.1	50
Sample tested	Renin value (pg/ml)	+ bilirubine at 0.2 mg/ml (pg/ml)
3..	22.6	20
4.	58.1	53.4

C. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

Sample	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	10	20.2 ± 1.7	8.5
B	10	67.7 ± 2.0	3.0

INTER-ASSAY PRECISION

Sample	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	6	15.5 ± 1.7	11
B	6	59.3 ± 2.4	4

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)
	1/4	258.6	
	1/8	129.3	125.5
	1/16	64.6	62.3
	1/32	32.3	29.4
	1/64	16.1	14.2
	1/128	8	6.7

Sample was diluted with zero calibrator
Value of undiluted sample : 1034 pg/ml

RECOVERY TEST

Added Renin (pg/ml)	Recovered Renin (pg/ml)	Recovery (%)
11.8	10.5	89
24.2	21.4	88
57	53	93
117	96	82

E. Hook effect

A sample spiked with human Renin up to 90 000 pg/ml gives a signal above the highest calibrator concentration.

F. Reference Intervals

Normal range (1,6 to 14,7 pg/ml) has been determined on 44 normal subjects with a mean value of 5,7 pg/ml.
Each laboratory should establish its own normal range of values.
Be careful many factors can influence renin levels (age, posture, estrogen treatment, antihypertensive medication,...)

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XV. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.
This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by Europe and approved and/or FDA approved methods and found negative for HbsAg, anti HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with the local safety procedures. All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVI. BIBLIOGRAPHY

- (1) Primary structure of the human Renin gene : Hardman J.A; and al. ; DNA (1984); 3(6):457-468.
- (2) Control of glomerular filtration rate by rennin-angiotensin system : Hall J. E. and al; Am.J.Physiol. (1977) : 233(5) :F366-F372
- (3) Raised aldosterone to renine ratio predicts antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study : Lim P.O. and al ; Br. J. Clin. Pharmacol. (1999) : 48(5) :756-760 .
- (4) Screening of primary aldosteronism :Schirpenbach C. and al ; Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.(2006) : 20(3) : 369-384 .
- (5) Diagnostic procedure in renovascular hypertension :Distler A. and al. Clinical nephrology (1991) :36(4):174-180
- (6) Circulating and tissue angiotensin systems :Campbell D.J. ; J. Clin . Invest. (1987) :79(1) :1-6

XVII SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS CONTROLS µl	SAMPLE(S) µl
INCUBATION Calibrators (0 to 6), controls Samples	- -	300 -	- 300
Tracer	100	100	100
Incubation	180 minutes at room temperature with shaking at 400 rpm		
Separation Working Wash solution Separation Working Wash solution Separation	-	Aspirate (or decant) 2 ml Aspirate (or decant) 2 ml Aspirate (or decant)	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource Catalogue Nr : KIP1531	P.I. Number : 1700473	Revision nr : 100517/1
-------------------------------------	--------------------------	---------------------------

Revision date: 2010-05-17

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

RENIN-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunométrique pour la mesure quantitative *in vitro* de la rénine active dans le plasma humain prélevé sur EDTA.

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. **Nom du produit :** DIASource Renin-IRMA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KIP1531 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8 B-1400 Nivelles Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CONTEXTE CLINIQUE

La rénine, une enzyme polypeptidique (PM ~ 40000) (1) également connue sous le nom d'angiotensinogénase, est une protéase circulante sécrétée par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire du rein en réponse à un volume sanguin bas ou un contenu corporel en NaCl faible.

La rénine active le système rénine-angiotensine en clivant l'angiotensinogène produit par le foie en angiotensine I (inactive) qui est ensuite elle-même convertie en angiotensine II (active) dans l'épithélium vasculaire du poumon. L'angiotensine II peut provoquer une vasoconstriction par stimulation du système nerveux central. De plus, elle stimule la sécrétion d'ADH (hormone antidiurétique) et de l'aldostérone par la glande surrénale. (6)

La régulation de la pression sanguine et le contrôle de la filtration glomérulaire (2) sont les fonctions les plus importantes du système rénine-angiotensine.

La concentration plasmatique en rénine est influencée par la concentration en angiotensinogène circulant et, par la suite, par la concentration en angiotensine II. Des taux plasmatiques élevés en angiotensine II réduisent la sécrétion de rénine (rétrocontrôle négatif).

La détermination des taux plasmatiques de la rénine est utile dans le diagnostic de l'hypertension et le suivi thérapeutique des patients hypertendus (3).

La concentration plasmatique en rénine diminue chez les patients ayant une hypertension due à un hyperaldostéronisme primaire (4), contrairement à l'hypertension rénovasculaire (5) où les concentrations en rénine et en aldostérone sont toutes les deux élevées.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La trousse DiaSource Renin-IRMA est une trousse de dosage radio-immunométrique en tube recouvert d'anticorps. AcM1, les anticorps de capture, sont attachés sur la surface basse et interne du tube plastic. Les calibrateurs ou les échantillons ajoutés dans les tubes présenteront dans un premier temps une faible affinité pour AcM1. L'addition d'AcM2, l'anticorps signal marqué à l'125I, complètera le système et déclenchera la réaction immunologique. Suite au lavage, la radioactivité restante liée au tube reflètera la concentration de l'antigène.

V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution			
 Tubes recouverts avec l'anti-Rénine (anticorps monoclonal)	2 x 48	Noir	Prêt à l'emploi			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> anti - Rénine marquée à l' ¹²⁵ Iodine (anticorps monoclonaux) dans un tampon phosphate avec du sérum bovin et de l'azoture de sodium (<0,1%)	Ab	¹²⁵ I	1 flacon 10,5 ml 760 kBq	Rouge	Prêt à l'emploi	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateur N = 0 à 6 dans du sérum humain avec du thymol. Voir les valeurs exactes sur chaque flacon.	CAL	N	7 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 2 ml d'eau distillée	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de Lavage (NaCl, Tween 20)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 40 ml	Vert	Diluer 20 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain avec du thymol	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 2 ml d'eau distillée	
CONTROL	N					

Note :

- Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.
- 1 pg de la préparation du calibrateur est équivalent à 2,2 +/- 0,2 pUI de NIBSC 68/356.

Les valeurs obtenues en pg/ml doivent être multipliées par 2,2 pour obtenir les résultats en pUI/ml ou mUI/l.

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 100 µl, 300 µl et 2 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
- Tubes en plastique pour l'activité totale
- Agitateur vortex
- Agitateur de tubes (400 tpm)
- Agitateur magnétique
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d'aspiration (optionnel)
- Tout compteur gamma capable de mesurer l'125I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- A. **Calibrateurs** : Reconstituer les calibrateurs avec 2 ml d'eau distillée.
! Pour une solubilisation complète : après reconstitution, laisser les flacons 15 minutes sur l'agitateur et ensuite les mélanger au vortex.
- B. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 2 ml d'eau distillée.
- C. **Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 19 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (20x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES RÉACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont instables. Les utiliser immédiatement après reconstitution, les congeler immédiatement en aliquotes et les maintenir à -20°C pendant maximum 6 semaines. Ils sont stables après 1 cycle de congélation-décongélation.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PRÉPARATION ET STABILITÉ DE L'ÉCHANTILLON

- Les échantillons doivent être du plasma prélevé sur EDTA.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 4 heures, le plasma doit être aliquoté et conservé à -20°C.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. MODE OPÉRATOIRE

- A. **Notes de manipulation**
Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration.
Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

- B. **Mode opératoire**
- Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, contrôle, échantillon. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts d'anticorps.
 - Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Puis distribuer 300 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
 - Distribuer 100 µl de l'anti-rénine marquée à l'iode¹²⁵ dans chaque tube, y compris dans les tubes non coâtés pour la mesure des activités totales.
 - Incuber pendant 180 minutes à température ambiante sous agitation (400 tpm).
 - Aspirer (ou décanter) le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
 - Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décanter). Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
 - Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer (ou décanter).
 - Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer (ou décanter) le reste de liquide.
 - Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RÉSULTATS

- Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en Rénine (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.
- Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
- L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNÉES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d’une courbe de calibration.

Renin-IRMA			cpm	B/T (%)
Activité totale				100
Calibrateur	0 pg/ml	0 µUI/ml	152	
	4 pg/ml	8,8 µUI/ml	579	0,14
	9 pg/ml	19,8 µUI/ml	984	0,27
	47 pg/ml	103,4 µUI/ml	3826	1,18
	95 pg/ml	209 µUI/ml	8161	2,58
	250 pg/ml	550 µUI/ml	20851	6,67
	520 pg/ml	1144 µUI/ml	55190	17,73

1 pg de la préparation du calibrateur est équivalent à 2,2 +/- 0,2 µUI de NIBSC 68/356.

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Sensibilité

Douze calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d’autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,78 pg/ml.

B. Spécificité

La réactivité croisée de la prorénine dans l’essai Renin IRMA a été déterminée en ajoutant différentes concentrations en prorénine à une matrice de plasma et en mesurant la réponse apparente de la rénine. La réactivité croisée de la prorénine s’est avéré être de 0,3%.

Les effets de l’interférence potentielle de 7,5 mg/ml d’hémoglobine et de 0,2 mg/ml de bilirubine ont été évalués. Les résultats de ce test (voir le tableau ci-dessous) montrent une diminution d’approximativement 10% des valeurs plasmatiques. Il est recommandé d’éviter les échantillons hémolysés et les échantillons contenant de la bilirubine.

Échantillons testés	Valeur de la rénine (pg/ml)	+ 7,5 mg/ml d’Hb humaine (pg/ml)
1.	21,2	18,5
2.	57,1	50
Échantillons testés	Valeur de la rénine (pg/ml)	+0,2 mg/ml de bilirubine (pg/ml)
3.	2,6	20
4.	58,1	53,4

C. Précision

INTRA-ANALYSE PRÉCISION

échantillon	N	<X> ± DS (pg/ml)	CV (%)
A	10	20,2 ± 1,7	8,5
B	10	67,7 ± 2,0	3,0

INTER-ANALYSE PRECISION

échantillon	N	<X> ± DS (pg/ml)	CV (%)
A	6	15,5 ± 1,7	11
B	6	59,3 ± 2,4	4

DS : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)
	1/4	258,6	
	1/8	129,3	125,5
	1/16	64,6	62,3
	1/32	32,3	29,4
	1/64	16,1	14,2
	1/128	8	6,7

L’échantillon a été dilué avec le calibrateur zéro.

Valeur de l’échantillon non dilué : 1034 pg/ml

TEST DE RÉCUPÉRATION

Rénine ajoutée (pg/ml)	Rénine récupérée (pg/ml)	Récupération (%)
11,8	10,5	89
24,2	21,4	88
57	53	93
117	96	82

E. Effet crochet

Un échantillon dopé avec de la rénine humaine jusqu’à 90000 pg/ml donne des cpm supérieurs au dernier point de calibration.

F. Valeurs Attendues

La fourchette des valeurs normales (1,6 à 14,7 pg/ml) a été déterminée sur 44 sujets normaux avec une moyenne de 5,7 pg/ml.

Chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

Être prudent: de nombreux facteurs peuvent influencer les taux de rénine (âge, position, traitement aux œstrogènes, médication antihypertensive,...)

XIV. CONTRÔLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l’intervalle spécifié sur l’étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l’on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d’échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d’acceptation pour les écarts des valeurs in duplo des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XVI. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l’¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35,5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l’achat, le stockage, l’utilisation et l’échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l’utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l’homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L’équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d’éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L’adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l’Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l’anti-HCV, l’anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l’assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d’hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs ou des échantillons de sérum devront être conformes aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d’animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l’ESB n’a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L’azoture de sodium est nocif s’il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l’azoture de sodium est utilisé comme agent conservateur). L’azoture dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l’eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

(1) Primary structure of the human Renin gene : Hardman J.A; and al. ; DNA (1984): 3(6):457-468.

(2) Control of glomerular filtration rate by rennin-angiotensin system : Hall J. E. and al; Am.J.Physiol. (1977) : 233(5) :F366-F372

(3) Raised aldosterone to renine ratio predicts antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study : Lim P.O. and al ; Br. J. Clin. Pharmacol. (1999) : 48(5) :756-760 .

(4) Screening of primary aldosteronism :Schirpenbach C. and al ; Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.(2006) : 20(3) : 369-384 .

(5) Diagnostic procedure in renovascular hypertension :Distler A. and al. Clinical nephrology (1991) :36(4):174-180

(6) Circulating and tissue angiotensin systems :Campbell D.J. ; J. Clin . Invest. (1987) :79(1) :1-6

XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	ACTIVITÉ TOTALE µl	CALIBRATEURS CONTROLES µl	ÉCHANTIL LON(S) µl
Calibrateurs (0 à 6), contrôles Echantillons	- -	300 -	- 300
Traceur	100	100	100
Incubation	180 minutes à température ambiante sous agitation (400 tpm)		
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	-	Aspirer (ou décanner) 2 ml Aspirer (ou décanner) 2 ml Aspirer (ou décanner)	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		

Numéro de catalogue DiaSource : KIP1531	Numéro de P.I.: 1700473/fr	Numéro de révision : 100712/1
--	-------------------------------	-------------------------------------

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

RENIN-IRMA

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro della Renina attiva in plasma umano con EDTA.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource Renin-IRMA Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1531: 96 tests
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0) 67 88.99.99

Fax: +32 (0) 67 88.99.96

III. INFORMAZIONI CLINICHE

La renina, un enzima polipeptidico (MW~ 40000) (1) altrimenti denominato angiotensinogenasi, è una proteasi circolante la cui secrezione da parte delle cellule juxtaglomerulari site nell'apparato juxtaglomerulare del rene avviene in risposta ad un volume ematico ridotto o a una ridotta presenza di NaCl nell'organismo.

La renina attiva il sistema renina-angiotensina convertendo l'angiotensinogeno prodotto nel fegato in angiotensina I (inattiva) che viene a sua volta convertita in angiotensina II (attiva) nell'epitelio vascolare del polmone. L'angiotensina II può causare vasocostrizione agendo sul sistema nervoso centrale, nonché stimolare la secrezione di ADH (ormone antidiuretico) e quella di aldosterone da parte della ghiandola surrenale (6).

La regolazione della pressione arteriosa e il controllo della filtrazione glomerulare renale (2) costituiscono le principali funzioni del sistema renina-angiotensina.

La concentrazione plasmatica di renina è influenzata dalla concentrazione dell'angiotensinogeno circolante e conseguentemente dalla concentrazione di angiotensina II. Elevati livelli plasmatici di angiotensina II riducono la secrezione di renina (feedback negativo).

La determinazione dei livelli plasmatici di renina è utile nelle diagnosi di ipertensione e nel follow up terapeutico del paziente iperteso (3).

Nei pazienti con ipertensione dovuta a iperaldosteronismo primario (4) è evidenziabile una riduzione della concentrazione plasmatica di renina, contrariamente a quanto avviene in caso di ipertensione renovascolare (5) ove è riscontrabile un aumento sia dei livelli di renina che di aldosterone.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit DiaSource Renin-IRMA è un dosaggio immunoradiometrico con separazione coated tube. Gli anticorpi di cattura, Mab 1, sono adsorbiti sulla superficie interna della parte inferiore di provette di polistirene. Standard e campioni hanno dapprima una bassa affinità per i Mab 1; l'aggiunta di anticorpi di segnale Mab 2, marcati con ¹²⁵I, provocano un aumento di affinità per i Mab 1 e l'inizio della reazione immunologica. Al termine dell'incubazione la radioattività non legata alla fase solida viene allontanata mediante lavaggio. La radioattività residua è direttamente proporzionale alla concentrazione di antigene.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione			
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti Renina (anticorpi monoclonali)	2 x 48	Nero	Pronte per l'uso			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Marcato: anti-Renina (Anticorpi monoclonali) marcati con ¹²⁵ I in tampone fosfato con siero bovino e sodio azide (<0,1%)	Ab	¹²⁵ I	1 flacone 10,5 ml 760 kBq	Rosso	Pronto per l'uso	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibratore 0-6 in siero umano contenente timolo (le concentrazioni esatte dei calibratori sono riportate sulle etichette dei flaconi)	CAL	N	7 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 2 ml di acqua distillata	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Tampone di lavaggio (NaCl, Tween 20)	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 40 ml	Verde	Diluire 20 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controlli: N = 1 o 2, in siero umano contenente timolo	CONTROL	N	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 2 ml di acqua distillata	
CONTROL	N					

Note: Usare il Calibratore zero per diluire i campioni.
1 pg della preparazione del calibratore equivale a 2,2 +/- 0,2 µIU NIBSC 68/356.
I Valori ottenuti in pg/ml devono essere moltiplicati per 2,2 per ottenere risultati in µIU/ml o mIU/l.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

- Acqua distillata.
- Pipette per dispensare 100 µl, 300 µl e 2 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
- Provette di plastica per l'attività totale.
- Agitatore tipo vortex.
- Agitatore rotante (400rpm).
- Agitatore magnetico.
- Pipetta a ripetizione automatica da 5 ml per i lavaggi.
- Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
- Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%).

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Calibratori** Ricostituire i calibratori con 2,0 ml di acqua distillata.
Per una solubilizzazione completa: dopo ricostituzione, porre i flaconi su agitatore per 15 minuti e poi su vortex.
- B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 2,0 ml di acqua distillata.
- C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 19 parti di acqua distillata a una parte di tampone di lavaggio concentrato (20 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- § I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- § Dopo ricostituzione, i calibratori e i controlli sono molto instabili, utilizzarli subito dopo ricostituzione, congelarli immediatamente in aliquote e mantenerli a -20°C per 6 settimane. Rimangono stabili dopo un ciclo di congelamento/scongelamento.
- § Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.
- § La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- § Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- § Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- § I campioni devono essere costituiti da plasma trattato con EDTA.
- § Qualora il test non dovesse essere effettuato entro 4 ore, il plasma dovrà essere suddiviso in aliquote e conservato a -20°C.
- § Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. **Avvertenze generali**
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.
Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.
Per evitare contaminazioni incrociate, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usa un nuovo reattivo o campione.
L'uso di pipette ben tarate e ad alta precisione o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.
Rispettare i tempi di incubazione.
Allestire una curva di taratura per ogni sessione analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sessioni analitiche precedenti.
- B. **Metodo del dosaggio**
 - Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
 - Agitare brevemente su vortex lo standard, i campioni e i controlli. Dispensare 300 µl di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
 - Distribuire 100 µl di anti-Renina marcata con ¹²⁵I in ogni provetta, comprese quelle non pre-adsorbite per l'attività totale.
 - Incubare 180 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione (400 rpm).
 - Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
 - Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
 - Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
 - Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residuo.
 - Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.
- XI. **CALCOLO DEI RISULTATI**
 - Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
 - Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie delle conte per minuto (cpm) di ogni standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di Renina. Scartare i duplicati palesemente discordanti.
 - Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
 - È possibile utilizzare un sistema automatico di interpolazione dati. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

Questi valori sono puramente indicativi, ciascun laboratorio potrà stabilire i propri intervalli normali relativi alla curva di taratura.

Renin-IRMA			cpm	B/T (%)
Attività totale				100
Calibratore	0 pg/ml	0 µIU/ml	152	
	4 pg/ml	8,8 µIU/ml	579	0,14
	9 pg/ml	19,8 µIU/ml	984	0,27
	47 pg/ml	103,4 µIU/ml	3826	1,18
	95 pg/ml	209 µIU/ml	8161	2,58
	250 pg/ml	550 µIU/ml	20851	6,67
	520 pg/ml	1144 µIU/ml	55190	17,73

1 pg della preparazione del calibratore equivale a 2,2 +/- 0,2 µIU NIBSC 68/356.

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Dodici duplicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media più 2 deviazioni standard di 20 duplicati dello standard zero, è risultata essere 0,78 pg/ml.

B. Specificità

In questo test di dosaggio IRMA della Renina, la reattività crociata della Prorenina è stata determinata misurando la risposta apparente di Renina dopo aggiunta di varie concentrazioni di Prorenina a una matrice plasmatica. La reattività crociata della Prorenina è risultata pari allo 0,3%.

Sono stati valutati i potenziali effetti di interferenza dell'emoglobina a 7,5 mg/ml e della bilirubina a 0,2 mg/ml. I risultati di questo test (vedi tabella sotto) mostrano una diminuzione dei valori plasmatici pari al 10% circa. Si raccomanda di evitare l'uso di campioni emolizzati e campioni contenenti bilirubina.

Campione analizzato	Valore della Renina (pg/ml)	+ emoglobina umana a 7,5 mg/ml (pg/ml)
1.	21,2	18,5
2.	57,1	50
Campione analizzato	Valore della Renina (pg/ml)	+ bilirubina a 0,2 mg/ml (pg/ml)
3.	2,6	20
4.	58,1	53,4

C. Precisione

INTRA-SAGGIO

Campione	N	<X> ± DS (pg/ml)	CV (%)
A	10	20,2 ± 1,7	8,5
B	10	67,7 ± 2,0	3,0

INTER-SAGGIO

Campione	N	<X> ± DS (pg/ml)	CV (%)
A	6	15,5 ± 1,7	11
B	6	59,3 ± 2,4	4

DS: Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pg/ml)	Concentrazione misurata (pg/ml)
	1/4	258,6	
	1/8	129,3	125,5
	1/16	64,6	62,3
	1/32	32,3	29,4
	1/64	16,1	14,2
	1/128	8	6,7

I campioni sono stati diluiti con il calibratore zero. Valori del campione puro: 1034 pg/ml.

RECOVERY TEST

Renina aggiunta (pg/ml)	Renina recuperata (pg/ml)	Recupero (%)
11,8	10,5	89
24,2	21,4	88
57	53	93
117	96	82

E. Effetto hook

Un campione ha a cui è stata aggiunta Renina fino a 90000 pg/ml ha cpm superiori a quello dello standard più concentrato.

F. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Il range di normalità (1,6-14,7 pg/ml) è stato determinato su 44 soggetti normali, con valore medio pari a 5,7 pg/ml. Ciascun laboratorio deve stabilire il proprio range di normalità. Da tenere presente che i livelli di renina possono essere influenzati da diversi fattori (età, postura, terapia estrogenica, farmaci antipertensivi...)

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non rientrano nei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote.
- I criteri di accettazione per la differenza tra i risultati in doppio dei campioni devono riflettere la Buona prassi di laboratorio.

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro. Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) che emette raggi X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizzanti. L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali. Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in appositi contenitori in locali preposti che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria devono essere destinati all'uso di isotopi specifici per evitare contaminazioni incrociate. In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni o siero secondo le procedure di sicurezza vigenti. Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni. Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle

tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

(1) Primary structure of the human Renin gene : Hardman J.A; and al. ; DNA (1984): 3(6):457-468.

(2) Control of glomerular filtration rate by rennin-angiotensin system : Hall J. E. and al; Am.J.Physiol. (1977) : 233(5) :F366-F372

(3) Raised aldosterone to renine ratio predicts antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study : Lim P.O. and al ; Br. J. Clin. Pharmacol. (1999) : 48(5) :756-760 .

(4) Screening of primary aldosteronism :Schirpenbach C. and al ; Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.(2006) : 20(3) : 369-384 .

(5) Diagnostic procedure in renovascular hypertension :Distler A. and al. Clinical nephrology (1991) :36(4):174-180

(6) Circulating and tissue angiotensin systems :Campbell D.J. ; J. Clin . Invest. (1987) :79(1) :1-6

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale ml	Calibratore Controlli ml	Campioni ml
<u>INCUBAZIONE</u> Calibratore (0 to 6), controlli Campioni	- -	300 -	- 300
Marcato	100	100	100
Incubazione	180 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione (400 rpm)		
Separazione Soluzione di lavoro Separazione Soluzione di lavoro Separazione	-	Aspirare (o decantare) 2 ml Aspirare (o decantare) 2 ml Aspirare (o decantare)	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIAsource : KIP1531	P.I. numero : 1700473/it	Revisione numero : 100712/1
--	-----------------------------	--------------------------------

Data di revisione : 2010-07-12

Leer el protocolo completo antes de usar.

RENIN-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Kit para ensayo inmunoradiométrico para la determinación cuantitativa in vitro de Renina activa en plasma/ EDTA humano.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre:** DIAsource Renin-IRMA Kit
- B. Número de Catálogo:** KIP1531 : 96 tests
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

La Renina, una enzima polipeptídica (PM ~ 40000) (1) conocida también como angiotensinogenasa, es una proteasa circulante secretada por las células yuxtaglomerulares en el aparato yuxtaglomerular de los riñones como respuesta a bajo volumen sanguíneo o bajo contenido de NaCl en el organismo.

La Renina activa el sistema renina-angiotensina dividiendo el angiotensinógeno producido en el hígado en Angiotensina I (inactiva) que a su vez es convertida en Angiotensina II (activa) en el epitelio vascular del pulmón. La Angiotensina II puede provocar vasoconstricción al estimular el sistema nervioso central, además estimula la secreción de la HAD (hormona anti diurética) y la secreción de aldosterona en la glándula suprarrenal.(6)

La regulación de la presión sanguínea y el control de la filtración glomerular (2) son las funciones más importantes del sistema renina-angiotensina.

La concentración plasmática de la renina está influenciada por la concentración del angiotensinógeno circulante y posteriormente por la concentración de la Angiotensina II. Niveles plasmáticos altos de Angiotensina II reducen la secreción de renina (retroalimentación negativa).

La determinación de los niveles plasmáticos de renina es útil en el diagnóstico de hipertensión y en el seguimiento terapéutico de los pacientes hipertensos (3).

La concentración plasmática de la renina disminuye en pacientes hipertensos debido a hiperaldosteronismo primario (4), al contrario de la hipertensión renovascular (5) donde tanto la concentración de la renina como la de aldosterona, están aumentadas.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

DiaSource Renin-IRMA es un ensayo inmunoradiométrico basado en un tubo recubierto. Mab1, el anticuerpo de captura, recubre la parte interna inferior del tubo de plástico. Los calibradores o muestras agregadas a los tubos manifestarán al principio una baja afinidad por Mab1. La adición de Mab2, el anticuerpo de señal marcado con ¹²⁵I, completa el sistema y desencadena la reacción inmunológica. Después de lavar, la radioactividad remanente en el tubo refleja la concentración del antígeno.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 test Kit	Código de Color	Reconstitución			
 Tubos recubiertos con anticuerpo Renina (anticuerpo monoclonal)	2 x 48	negro	Listo para uso			
<table border="1"><tr><td>Ab</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Anti-Renin- ¹²⁵ I (anticuerpo monoclonal) en tampón fosfato con suero bovino, azida (<0,1%)	Ab	¹²⁵ I	1 vial 10,5 ml 760 kBq	rojo	Listo para uso	
Ab	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores 0-6 en suero humano y thymol (mirar los valores exactos en las etiquetas)	CAL	N	7 viales liofilizados	amarillo	Añadir 2,0 ml de agua destilada	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solución de lavado (Tween 20- NaCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 40 ml	verde	Diluir 20 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls - N = 1 or 2 en suero humano y thymol	CONTROL	N	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 2,0 ml de agua destilada	
CONTROL	N					

Nota: 1. Use el calibrador cero para diluir muestras.
2. 1 pg de la preparación del calibrador es equivalente a 2,2 +/- 0,2 µIU de NIBSC 68/356.
Los valores obtenidos en pg/ml deben ser multiplicados por 2,2 para obtener resultados en µIU/ml o mIU/l.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 100 µl, 300 µl and 2 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Tubos plásticos para recuento total
4. Vortex
5. Agitador de tubos (400rpm)
6. Agitador magnético
7. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
8. Sistema de aspiración (opcional)
9. Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituya el calibrador con 2,0 ml de agua destilada.
! Para una disolución total : después de reconstituir, deje el vial 15 min en un agitador, luego en un agitador vórtice.
- B. **Controles:** Reconstituya los controles con 2,0 ml de agua destilada.
- C. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 19 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (20x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Después de reconstituídos, los calibradores y controles son muy inestables, por lo que deben utilizarse inmediatamente después de la reconstitución, congelarse enseguida en partes alícuotas y mantenerse a –20° C durante 6 semanas. Son estables después de congelar y descongelar 1 vez.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras deben ser de plasma anticoagulado con EDTA.
- Si el ensayo no se realiza en 4 hrs., el plasma debe ser alícuotado y almacenado a –20°C.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

X. PROTOCOLO

- A. **Notas de manejo**
No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.
Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

- B. **Protocolo**
 1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
 2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 300 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
 3. Dispensar 100 µl de anti Renina marcado con ¹²⁵Yodo en cada tubo, incluyendo los tubos correspondientes a las Cuentas Totales.
 4. Incubar durante 180 minutos a temperatura ambiente en agitación constante (400 rpm).
 5. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
 6. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado.
 7. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar).
 8. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
 9. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Representar en un gráfico semilogarítmico o linear las c.p.m. (ordenada) para cada calibrador frente a las concentraciones de Renina (abscisa) y dibujar una curva de calibración por los puntos de calibración, rechazando los extremos claros.
3. Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
4. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “ 4 parámetros”.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

Renin-IRMA			cpm	B/T (%)
Cuentas Totales				100
Calibrador	0 pg/ml	0 µIU/ml	152	
	4 pg/ml	8,8 µIU/ml	579	0,14
	9 pg/ml	19,8 µIU/ml	984	0,27
	47 pg/ml	103,4 µIU/ml	3826	1,18
	95 pg/ml	209 µIU/ml	8161	2,58
	250 pg/ml	550 µIU/ml	20851	6,67
	520 pg/ml	1144 µIU/ml	55190	17,73

1 pg de la preparación del calibrador es equivalente a 2,2 +/- 0,2 µIU de NIBSC 68/356

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

a. Limite de detección

Doce calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores. El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares sobre la media de enlace del calibrador cero, fue de 0,78 pg/ml.

b. Especificidad

La reacción cruzada de la Prorenina en este ensayo Renin IRMA fue determinada agregando varias concentraciones de Prorenina a una matriz plasmática y midiendo la repuesta aparente de la Renina. La reactividad cruzada de Prorenina se determinó en 0,3%.

Los efectos potenciales de interferencia de la hemoglobina a 7,5 mg/ml y de la bilirrubina a 0,2 mg/ml han sido evaluados. Los resultados de esta prueba (ver la tabla a continuación) muestran una disminución de aproximadamente 10% de los valores plasmáticos. La recomendación es evitar muestras hemolizadas y muestras que contengan bilirrubina.

Muestra analizada	Valor renina (pg/ml)	+ Hb humana a 7,5 mg/ml (pg/ml)
1.	21,2	18,5
2.	57,1	50
Muestra analizada	Valor renina (pg/ml)	+ bilirubina a 0,2 mg/ml (pg/ml)
3.	2,6	20
4.	58,1	53,4

c. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO

Muestra	N	<> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	10	20,2 ± 1,7	8,5
B	10	67,7 ± 2,0	3,0

PRECISIÓN INTER-ENSAYO

Muestra	N	<> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	6	15,5 ± 1,7	11
B	6	59,3 ± 2,4	4

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

d. Exactitud

TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (pg/ml)	Concent. Medida (pg/ml)
	1/4	258,6	
	1/8	129,3	125,5
	1/16	64,6	62,3
	1/32	32,3	29,4
	1/64	16,1	14,2
	1/128	8	6,7

Las muestras fueron diluidas con calibrador cero
Valor de la muestra sin diluir: 1034 pg

TEST DE RECUPERACIÓN

añadido Renina (pg/ml)	Recuperado Renina (pg/ml)	Recuperado (%)
11,8	10,5	89
24,2	21,4	88
57	53	93
117	96	82

e. Efecto de gancho

Una muestra a la que se le agregó Renina humana hasta 90 000 pg/ml da una señal por sobre la concentración más alta del calibrador.

f. INTERVALOS DE REFERENCIA

Rango normal (1,6 a 14,7 pg/ml) ha sido determinado en 44 sujetos normales con un valor promedio de 5,7 pg/ml.
Cada laboratorio debe establecer sus propios valores de rango normal.
Tenga cuidado, muchos factores pueden influenciar los niveles de renina (edad, postura, tratamiento con estrógeno, medicamentos antihipertensivos,...)

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, los cuales se guardan en alícuotas congeladas. No congelar y descongelar más de dos veces.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados de los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.
Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35,5 keV) ionizantes.
Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.
Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.
Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.
Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido

informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas. Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida. No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVI. BIBLIOGRAFIA

(1) Primary structure of the human Renin gene : Hardman J.A; and al. ; DNA (1984): 3(6):457-468.

(2) Control of glomerular filtration rate by rennin-angiotensin system : Hall J. E. and al; Am.J.Physiol. (1977) : 233(5) :F366-F372

(3) Raised aldosterone to renine ratio predicts antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study : Lim P.O. and al ; Br. J. Clin. Pharmacol. (1999) : 48(5) :756-760 .

(4) Screening of primary aldosteronism :Schirpenbach C. and al ; Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.(2006) : 20(3) : 369-384 .

(5) Diagnostic procedure in renovascular hypertension :Distler A. and al. Clinical nephrology (1991) :36(4):174-180

(6) Circulating and tissue angiotensin systems :Campbell D.J. ; J. Clin . Invest. (1987) :79(1) :1-6

XVII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (µl)	CALIBRADORES CONTROL(ES) (µl)	MUESTRAS (µl)
<u>INCUBACIÓN</u> Calibradores (0 to 6), controles Muestras	- -	300 -	- 300
Trazador	100	100	100
Incubación	180 minutos a T.A en agitación constante (400 rpm)		
Separación Solución de Lavado Separación Solución de Lavado Separación	-	Aspirar (o decantar) 2,0 ml Aspirar (o decantar) 2,0 ml Aspirar (o decantar)	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

DiaSource Catalogo Nr : KIP1531	P.I. Numero : 1700473/es	Revisión nr : 100712/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

fecha de la revisión: 2010-07-12

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

RENIN-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Κιτ ανοσοραδιομετρικού προσδιορισμού για τον in vitro ποσοτικό προσδιορισμό της ενεργούς ρενίνης σε ανθρώπινο πλάσμα με EDTA.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία:** Renin-IRMA της DiaSource
- B. Αριθμός καταλόγου:** KIP1531 : 96 προσδιορισμοί
- Γ. Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99 Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Η ρενίνη, ένα πολυπεπτιδικό ένζυμο (MB~ 40000) (1), γνωστή επίσης ως αγγειοτασινογενάση, είναι μια κυκλοφορούσα πρωτεάση που εκκρίνεται από παρασπειραματικά κύτταρα στην παρασπειραματική συσκευή των νεφρών, ως απόκριση σε μειωμένο όγκο αίματος ή χαμηλή συγκέντρωση NaCL στο σώμα.

Η ρενίνη ενεργοποιεί το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης μετατρέποντας το παραγόμενο στο ήπαρ αγγειοτασινογόνο σε αγγειοτασίνη I (ανενεργή), η οποία κατόπιν μετατρέπεται σε αγγειοτασίνη II (ενεργή) στο αγγειακό επιθήλιο των πνευμόνων. Η αγγειοτασίνη II μπορεί να επιφέρει αγγειοσυσπασση μέσω διέγερσης του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επιπλέον διεγείρει την έκκριση ADH (αντιδιουρητική ορμόνη) και αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια (6).

Οι σημαντικότερες λειτουργίες του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης είναι η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και ο έλεγχος της νεφρικής σπειραματικής διήθησης (2).

Η συγκέντρωση της ρενίνης στο πλάσμα επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του κυκλοφορούντος αγγειοτασινογόνου και επομένως, από τη συγκέντρωση της αγγειοτασίνης II. Τα υψηλά επίπεδα αγγειοτασίνης II στο πλάσμα επιφέρουν μείωση της έκκρισης ρενίνης (αρνητική ανατροφοδότηση)

Ο καθορισμός των επιπέδων ρενίνης στο πλάσμα είναι χρήσιμος στη διάγνωση της υπέρτασης και στην παρακολούθηση της θεραπείας υπερτασικών ασθενών (3).

Η συγκέντρωση ρενίνης στο πλάσμα υπερτασικών ασθενών είναι μειωμένη λόγω πρωτοπαθούς υπεραλδοστερονισμού (4), σε αντίθεση με την νεφραγγειακή υπέρταση (5), όπου αυξάνονται οι συγκεντρώσεις τόσο της ρενίνης όσο και της αλδοστερόνης.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η εξέταση Renin-IRMA της DiaSource είναι ένας ανοσοραδιομετρικός προσδιορισμός που βασίζεται σε διαχωρισμό επιστρωμένων σωληναρίων. Το Mab 1, το αντίσωμα σύλληψης, προσκολλάται στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια του πλαστικού σωληναρίου. Οι βαθμονομητές ή τα δείγματα που προστίθενται στα σωληνάρια θα επιδείξουν αρχικά χαμηλό βαθμό συγγένειας για το Mab 1. Προσθήκη Mab 2, του αντισώματος σήματος, το οποίο είναι σηματοδωμένο με ¹²⁵I, θα ολοκληρώσει το σύστημα και θα ενεργοποιήσει την ανοσολογική αντίδραση. Μετά την πλύση, η υπολειπόμενη ραδιενέργεια, που είναι δεσμευμένη στο σωληνάριο, αντανακλά τη συγκέντρωση του αντιγόνου.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισ- μών	Χρωματι- κός κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με Αντι-ρενίνη (μονοκλωνικό αντίσωμα)	2 x 48	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
Ab ¹²⁵I Μονοκλωνικά αντισώματα αντι-ρενίνης σηματοδωμένα με ¹²⁵Iωδίνη σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με βόειο ορό, αζίδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 10,5 ml 760 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
CAL N Βαθμονομητές N = 0 έως 6 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων)	7 φιαλίδια λαιοφιλοποι- ημένο	κίτρινο	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (NaCl, Tween 20)	1 φιαλίδιο 40 ml	πράσινο	Αραιώστε 20 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη	2 φιαλίδια λαιοφιλοποι- ημένο	ασημί	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.
2. 1 pg του παρασκευάσματος βαθμονομητή αντιστοιχεί σε 2,2 +/- 0,2 mIU του NIBSC 68/356.
Οι τιμές που λαμβάνονται σε pg/ml πρέπει να πολλαπλασιάζονται επί 2,2 για τη λήψη αποτελεσμάτων σε mIU/ml ή mIU/l.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό
- Πιπέτες για διανομή: 100 μl, 300 μl και 2 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακρίβειας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Πλαστικά σωληνάρια για ολικές μετρήσεις
- Αναμεικτής στροβιλισμού (τύπου vortex)
- Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (400rpm)
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
- Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απαριθμητής μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης της ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

A. Βαθμονομητές: Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 2,0 ml απεσταγμένου νερού.
! Για πλήρη διαλυτότητα : Μετά την ανασύσταση αφήστε τα φιαλίδια για 15 λεπτά σε δονητή και κατόπιν αναδεύστε ξανά σε αναδευτήρα vortex.
B. Οροί ελέγχου: Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 2,0 ml απεσταγμένου νερού.
Γ. Διάλυμα πλύσης εργασίας: Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 19 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (20x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΛΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου είναι ασταθείς. Χρησιμοποιήστε τους αμέσως μετά την ανασύσταση, καταψύζετε τους αμέσως σε κλάσματα και διατηρήστε τους στους -20°C για έως και 6 εβδομάδες. Παραμένουν σταθεροί μετά από 1 κύκλο κατάψυξης-απόψυξης.
- Αποφεύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα πρέπει να είναι πλάσμα με EDTA.
- Εάν η δοκιμασία δεν εκτελεστεί εντός 4 ωρών, το πλάσμα θα πρέπει να χωριστεί σε κλάσματα και να φυλαχθεί στους -20°C.
- Αποφεύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμειξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

B. Διαδικασία

- Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα και ορό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
- Αναμειξτε για λίγο (με αναμεικτή στροβιλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, ορούς ελέγχου και δείγματα και διανείμετε 300 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
- Διανείμετε 100 μl αντι-ρενίνη σηματοδωμένου με ¹²⁵I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
- Επώαστε επί 180 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων στις 400 rpm.
- Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
- Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
- Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
- Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
- Υποβάλλετε σε μέτρηση τα σωληνάρια σε απαριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της ρενίνης (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
- Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη

επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΛΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

Renin-IRMA		cpm	B/T (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵ I ("total")			100
Βαθμονομητής	0 pg/ml 0 μIU/ml	152	
	4 pg/ml 8,8 μIU/ml	579	
	9 pg/ml 19,8 μIU/ml	984	0,14
	47 pg/ml 103,4 μIU/ml	3826	0,27
	95 pg/ml 209 μIU/ml	8161	1,18
	250 pg/ml 550 μIU/ml	20851	2,58
	520 pg/ml 1144 μIU/ml	55190	6,67
			17,73

1 pg του παρασκευάσματος βαθμονομητή αντιστοιχεί σε 2,2 +/- 0,2 μIU του NIBSC 68/356.

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης
Μετρήθηκαν δώδεκα μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ομάδα των άλλων βαθμονομητών.
Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,78 pg/ml.

B. Ειδικότητα
Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα της προ-ρενίνης σε αυτόν τον IRMA προσδιορισμό ρενίνης προσδιορίστηκε μέσω προσθήκης προ-ρενίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις σε μία μήτρα πλάσματος και μετρώντας την εμφανή απόκριση της ρενίνης. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα της ρενίνης βρέθηκε να είναι 0,3 %.

Αξιολογήθηκαν τα δυνατικά αποτελέσματα παρεμβολής της αιμοσφαιρίνης στα 7,5 mg/ml και της χολερυθρίνης στα 0,2 mg/ml. Τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμής (βλ. παρακάτω πίνακα) δείχνουν μία μείωση των τιμών πλάσματος κατά περίπου 10%. Συνιστάται η αποφυγή αιμολυμένων δειγμάτων και δειγμάτων που περιέχουν χολερυθρίνη.

Δείγμα που ελέγχθηκε	Τιμή ρενίνης (pg/ml)	+ Ανθρώπινη Hb στα 7,5 mg/ml (pg/ml)
1.	21,2	18,5
2.	57,1	50
Δείγμα που ελέγχθηκε	Τιμή ρενίνης (pg/ml)	+ Χολερυθρίνη στα 0,2 mg/ml (pg/ml)
3.	2,6	20
4.	58,1	53,4

C. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

Δείγμα	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)
A	10	20,2 ± 1,7	8,5
B	10	67,7 ± 2,0	3,0

ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Δείγμα	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)
A	6	15,5 ± 1,7	11
B	6	59,3 ± 2,4	4

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

D. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (pg/ml)
	1/4	258,6	
	1/8	129,3	125,5
	1/16	64,6	62,3
	1/32	32,3	29,4
	1/64	16,1	14,2
	1/128	8	6,7

Το δείγμα αραιώθηκε με το μηδενικό βαθμονομητή.

Τιμή του μη αραιωμένου δείγματος : 1034 pg/ml

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Προσθεθείσα ρενίνη (pg/ml)	Ανακτηθείσα ρενίνη (pg/ml)	Ανακτηθείσα (%)
11,8	10,5	89
24,2	21,4	88
57	53	93
117	96	82

E. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

Δείγμα που εμβολιάστηκε με ρενίνη έως 90000 pg/ml δίνει σήμα πάνω από την υψηλότερη συγκέντρωση του βαθμονομητή.

F. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Το φυσιολογικό εύρος (1,6 έως 14,7 pg/ml) προσδιορίστηκε σε 44 φυσιολογικά υποκείμενα με μέση τιμή 5,7 pg/ml.

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του φυσιολογικό εύρος τιμών.

Χρειάζεται προσοχή, διότι υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα ρενίνης (ηλικία, στάση, θεραπεία με οιστρογόνα, αντυπερτασική αγωγή...).

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατενυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35,5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-

HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων ή δειγμάτων ορού θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας. Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο κιτ αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Primary structure of the human Renin gene : Hardman J.A; and al. ; DNA (1984); 3(6):457-468.
- (2) Control of glomerular filtration rate by rennin-angiotensin system : Hall J. E. and al; Am.J.Physiol. (1977) : 233(5) :F366-F372
- (3) Raised aldosterone to renine ratio predicts antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study : Lim P.O. and al ; Br. J. Clin. Pharmacol. (1999) : 48(5) :756-760 .
- (4) Screening of primary aldosteronism :Schirpenbach C. and al ; Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.(2006) : 20(3) : 369-384 .
- (5) Diagnostic procedure in renovascular hypertension :Distler A. and al. Clinical nephrology (1991) :36(4):174-180
- (6) Circulating and tissue angiotensin systems :Campbell D.J. ; J. Clin . Invest. (1987) :79(1) :1-6

XVII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ (μl)	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ ΥΛΙΚΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (μl)	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) (μl)
ΕΠΩΑΣΗ Βαθμονομητές (0 έως 6), οροί ελέγχου Δείγματα	- -	300 -	- 300
Ιχνηθέτης	100	100	100
Επώαση	180 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση στις 400 rpm		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	- - - - -	Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DiaSource: KIP1531	Αριθμός P.I.: 1700473/el	Αρ. αναθεώρησης: 100712/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

ημερομηνία αναθεώρησης : 2010-07-12

	<u>Used symbols</u>	<u>Symboles utilisés</u>
	Consult instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation
	Storage temperature	Température de conservation
	Use by	Utiliser jusque
	Batch code	Numéro de lot
	Catalogue number	Référence de catalogue
	Control	Contrôle
	In vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Manufacturer	Fabricant
	Contains sufficient for <n> tests	Contenu suffisant pour <n> tests
	Wash solution concentrated	Solution de lavage concentrée
	Zero calibrator	Calibrateur zéro
	Calibrator #	Calibrateur #
	Control #	Contrôle #
	Tracer	Traceur
	Tracer	Traceur
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tubes	Tubes
	Incubation buffer	Tampon d'incubation
	Acetonitrile	Acétonitrile
	Serum	Sérum
	Specimen diluent	Diluant du spécimen
	Dilution buffer	Tampon de dilution
	Antiserum	Antisérum
	Immunoabsorbent	Immunoabsorbant
	Calibrator diluent	Diluant de calibrateur
	Reconstitution solution	Solution de reconstitution
	Polyethylene glycol	Glycol Polyéthylène
	Extraction solution	Solution d'extraction
	Elution solution	Solution d'élution
	Bond Elut Silica cartridges	Cartouches Bond Elut Silica
	Pre-treatment solution	Solution de pré-traitement
	Neutralization solution	Solution de neutralisation
	Tracer buffer	Tampon traceur
	Microtiterplate	Microplaque de titration
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	Conjugate buffer	Tampon conjugué
	Chromogenic TMB concentrate	Chromogène TMB concentré
	Chromogenic TMB solution	Solution chromogène TMB
	Substrate buffer	Tampon substrat
	Stop solution	Solution d'arrêt
	Incubation serum	Sérum d'incubation
	Buffer	Tampon
	AP Conjugate	AP Conjugué
	Substrate PNPP	Tampon PNPP
	Biotin conjugate concentrate	Biotine conjugué concentré
	Avidine HRP concentrate	Avidine HRP concentré
	Assay buffer	Tampon de test
	Biotin conjugate	Biotine conjugué
	Specific Antibody	Anticorps spécifique
	Streptavidin HRP concentrate	Concentré streptavidine HRP
	Non-specific binding	Liant non spécifique
	2nd Antibody	Second anticorps
	Acidification Buffer	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Gebrauchsanweisung beachten
	Bewaartemperatuur	Lagern bei
	Houdbaar tot	Verwendbar bis
	Lotnummer	Chargenbezeichnung
	Catalogusnummer	Bestellnummer
	Controle	Kontrolle
	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek	In Vitro Diagnostikum
	Fabrikant	Hersteller
	Inhoud voldoende voor <n> testen	Ausreichend für <n> Ansätze
	Wasoplossing, geconcentreerd	Waschlösung-Konzentrat
	Nulkalibrator	Null kalibrator
	Kalibrator #	Kalibrator #
	Controle #	Kontrolle #
	Tracer	Tracer
	Tracer	Tracer
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Buisjes	Röhrchen
	Incubatiebuffer	Inkubationspuffer
	Acetonitrile	Azetonitril
	Serum	Humanserum
	Specimen diluent	Probenverdünner
	Verdunningsbuffer	Verdünnungspuffer
	Antiserum	Antiserum
	Immunoabsorbent	Immunadsorbens
	Kalibratorverdunner	Kalibratorverdünnung
	Reconstitutieoplossing	Rekonstitutionslösung
	Polyethyleen glycol	Polyethylenglykol
	Extractieoplossing	Extraktionslösung
	Elutieoplossing	Eluierungslösung
	Bond Elut Silica kolom	Bond Elut Silikakartuschen
	Pre-behandelingsoplossing	Vorbehandlungslösung
	Neutralisatieoplossing	Neutralisierungslösung
	Tracerbuffer	Tracer-Puffer
	Microtiterplaat	Mikrotiterplatte
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	Conjuaat buffer	Konjugatpuffer
	Chromogene TMB geconcentreerd	Chromogenes TMB Konzentrat
	Chromogene Oplossing TMB	Farblösung TMB
	Substraatbuffer	Substratpuffer
	Stopoplossing	Stopplösung
	Incubatieserum	Inkubationsserum
	Buffer	Puffer
	AP Conjuaat	AP Konjugat
	Substraat PNPP	Substrat PNPP
	Geconcentreerd Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuaat	Avidin-HRP-Konzentrat
	Assay buffer	Assaypuffer
	Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat
	Specifiek antilichaam	Spezifischer Antikörper
	Streptavidine-HRP concentraat	HRP Streptavidinkonzentrat
	Aspecifieke binding	Unspezifische Bindung
	2de antilichaam	Sekundärer Antikörper
	Verzuringbuffer	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso	Consultar las instrucciones de uso
	Limitazioni di temperatura	Limitación de temperatura
	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Numero di lotto	Código de lote
	Numero di catalogo	Número de catálogo
	Controllo	Control
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabbricante	Fabricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Tampone di lavaggio concentrato	Solución de lavado concentrada
	Calibratore zero	Calibrador cero
	Standard #	Calibrador #
	Controllo #	Control #
	Marcato	Trazador
	Marcato	Trazador
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Provette	Tubos
	Tampone incubazione	Tampón de incubación
	Acetonitrile	Acetonitrilo
	Siero	Suero
	Diluente campione	Diluyente de Muestra
	Tampone diluizione	Tampón de dilución
	Antisiero	Antisuero
	Immunoassorbente	Inmunoadsorbente
	Diluente calibratore	Diluyente de calibrador
	Soluzione di ricostituzione	Solución de Reconstitución
	Polietilenglicole	Glicol Polietileno
	Soluzione di estrazione	Solución de extracción
	Soluzione di eluizione	Solución de elución
	Cartucce di silice bond elut	Cartuchos Bond Elut Silica
	Soluzione di pretrattamento	Solución de Pre-tratamiento
	Soluzione di neutralizzazione	Solución de Neutralización
	Tracer Buffer	Tampón de trazador
	Piastra di microtitolazione	Placa de microvaloración
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	Buffer coniugato	Tampón de Conjugado
	Cromogena TMB concentrato	Cromógena TMB concentrada
	Soluzione cromogena TMB	Solución Cromógena TMB
	Tampone substrato	Tampón de sustrato
	Soluzione di arresto	Solución de Parada
	Incubazione con siero	Suero de Incubación
	Buffer	Tampón
	AP Coniugato	AP Conjugado
	Substrato PNPP	Sustrato PNPP
	Concentrato coniugato con biotina	Concentrado de conjugado de biotina
	Concentrato avidina HRP	Concentrado avidina-HRP
	Soluzione tampone per test	Tampón de ensayo
	Coniugato con biotina	Conjugado de biotina
	Anticorpo Specifico	Anticuerpo específico
	Streptavidina-HRP concentrata	Estreptavidina-HRP Concentrado
	Legame non-specifico	Unión no específica
	2° Anticorpo	Segundo anticuerpo
	Tampone Acidificante	Tampón de Acidificación

	<u>Símbolos utilizados</u>	<u>Använda symboler</u>
	Consulte instruções de utilização	Läs instruktionerna före användning
	Temperatura de conservação	Förvaringstemperatur
	Utilizar antes de	Används av
	Código de lote	Lotnummer
	Número de catálogo	Katalognummer
	Controlo	Kontroll
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	In vitro diagnostiskt kit
	Fabricante	Tillverkare
	Conteúdo suficiente para <n> testes	Innehållet räcker till <n> prover
	Solução de lavagem concentrada	Tvättlösning, koncentrerad
	Calibrador zero	Nollkalibrerare
	Calibrador #	Kalibrator #
	Controlo #	Kontroll #
	Marcador	Radioisotop, antigen
	Marcador	Radioisotop, antikropp
	Marcador concentrada	Radioisotop, antigen koncentrerad
	Marcador concentrada	Radioisotop, antikropp koncentrerad
	Tubos	Rör
	Tampão de incubação	Inkuberingsbuffert
	Acetonitrilo	Acetonitril
	Soro	Serum
	Diluidor de espécimes	Spädningsbuffert för prover
	Tampão de diluição	Spädningsbuffert
	Anti-soro	Antiserum
	Imunoadsorvente	Immunoadsorberare
	Diluyente do calibrador	Kalibratordiluent
	Solução de Reconstituição	Rekonstitutionslösning
	Polietileno-glicol	Polyetylglykol
	Solução de Extração	Extraktionslösning
	Solução de Eluição	Elueringslösning
	Cartuchos de sílica Bond Elut	Silikonpatroner för elueringsbindning
	Solução de pré-tratamento	Förbehandlingslösning
	Solução de neutralização	Neutraliseringslösning
	Tampão Marcador	Tracerbuffert
	Placa de micro titulação	Microtiterplatta
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	Conjuge o tampão	Konjugatbuffert
	Cromogénica TMB concentrada	Kromogeniskt TMB-koncentrat
	Solução Cromogénica TMB	Kromogenisk TMB-lösning
	Tampão de substrato	Substratbuffert
	Solução de Paragem	Stoplösning
	Soro de incubação	Inkubationsserum
	Tampão	Buffert
	AP Conjugação	AP-konjugat
	Substrato PNPP	Substrat-PNPP
	Concentrado conjugado de biotina	Biotinkonjugat koncentrat
	Concentrado HRP de avidina	Avidin HRP-koncentrat
	Tampão de ensaio	Provbuffert
	Conjugado de biotina	Biotinkonjugat
	Anticorpo específico	-
	Estreptavidina HRP concentrado	-
	Ligações não específicas	-
	Anticorpo secundário	-
	Tampão de acidificação	-

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>	<u>Anvendte symboler</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Læs brugsvejledningen
	Θερμοκρασία αποθήκευσης	Opbevaringstemperatur
	Ημερομηνία λήξης	Anvend inden
	Αριθμός παρτίδας	Batchkode
	Αριθμός καταλόγου	Katalognummer
	Πρότυπο ελέγχου	Kontrol
	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
	Κατασκευαστής	Fabrikant
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις	Indeholder nok til <n> test
	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης	Koncentreret vaskeopløsning
	Μηδενικός βαθμονομητής	Nul-kalibrator
	Βαθμονομητής #	Kalibrator nr.
	Ορός ελέγχου #	Kontrol nr.
	Ιχνηθέτης	Markør
	Ιχνηθέτης	Markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Σωληνάριο	Tuber
	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	Inkubationsbuffer
	Ακετονιτρίλιο	Acetonitril
	Ορός	Serum
	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων	Prøvediluent
	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	Fortyndingsbuffer
	Αντιορός	Antiserum
	Ανοσοπροσροφητικό	Immonoadsorbent
	Αραιωτικό βαθμονομητών	Kalibratordiluent
	Διάλυμα ανασύστασης	Rekonstitueringsopløsning
	Πολυαιθυλενογλυκόλη	Polyetylenglykol
	Διάλυμα εκχύλισης	Ekstraktionsopløsning
	Διάλυμα έκλουσης	Elueringsopløsning
	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut	Patroner med bindingselueringssilica
	Διάλυμα προεπεξεργασίας	Forbehandlingsopløsning
	Διάλυμα εξουδετέρωσης	Neutraliseringsopløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Markørbuffer
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης	Mikrotiterplade
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	Konjugatbuffer
	Χρωμογόνος TMB	Kromogen TMB-koncentreret
	Διάλυμα χρωμογόνου TMB	Kromogen TMB-opløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος	Substratbuffer
	Ανασχετικό αντιδραστήριο	Stopopløsning
	Ορός επώασης	Inkubationsserum
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Buffer
	AP Σύζευγμα	AP-konjugat
	PNPP υποστρώματος	Substrat PNPP
	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat koncentrat
	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP	Avidin HRP koncentrat
	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	Prøvebuffer
	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat
	Ειδικό Αντίσωμα	-
	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP	-
	μη-ειδική δέσμευση	-
	2ο Αντίσωμα	-
	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο	-

	<u>Stosowane symbole</u>	<u>Használt szimbólumok</u>
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją	Olvassa el a használati útmutatót
	Temperatura przechowywania	Tárolási hőmérséklet
	Zużyć przed	Lejáráti idő
	Kod serii	Gyártási kód
	Numer katalogowy	Katalógus szám
	Kontrola	Kontrol
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	In vitro diagnosztikai eszköz
	Producent	Gyártó
	Zawartość wystarczająca do <n> testów	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
	Roztwór płuczący stężony	Mosó folyadék koncentrátum
	Kalibrator zerowy	Zero kalibrátor
	Kalibrator nr	Kalibrátor #
	Kontrola nr	Kontrol #
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Probówki	Csővek
	Wymagana inkubacja buforu	Inkubáló puffer
	Acetonitryl	Acetonitril
	Surowica	Szérum
	Rozcieńczalnik próbki	Mintahígító
	Bufor do rozcieńczania	Hígító puffer
	Antysurowica	Antiszérum
	Immunoabsorbent	Immunadszorbens
	Rozcieńczalnik kalibratora	Kalibrátor hígító
	Roztwór do rozcieńczania	Mintaelőkészítő oldat
	Glikol poli(oksy)etylenowy	Polietilén glikol
	Roztwór ekstrakcyjny	Extrakciós oldat
	Roztwór elucyjny	Eluáló oldat
	Kolumny krzemionkowe Bond Elut	Bond Elut Silica szilikagél patronok
	Roztwór do przygotowania wstępnego	Előkezelő oldat
	Roztwór neutralizujący	Semlegesítő oldat
	Bufor znacznika	Nyomjelző izotóp hígító puffer
	mikro płytki	Mikrotiter lemez
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Bufor do koniugacji	Konjugátum puffer
	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)	Kromogén TMB koncentrátum
	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)	Kromogén TMB oldat
	Bufor substratu	Szubsztrát puffer
	Roztwór zatrzymujący reakcję	Stop oldat
	Wymagana inkubacja surowicy	Inkubációs szérum
	Bufor	Puffer
	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)	AP konjugátum
	p-nitrofenylofosforan substratowy	Szubsztrát PNPP
	Koncentrat koniugatu biotyny	Biotin konjugátum koncentrátum
	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną	Avidin HRP koncentrátum
	Bufor do oznaczania	Vizsgálati puffer
	Koniugatu biotyny	Biotin konjugátum
	Przeciwciało swoiste	Specifikus ellenanyag
	Koncentrat streptawidyny HRP	Sztreptawidin HRP koncentrátum
	Wiązanie nieswoiste	Nem-specifikus kötődés
	Drugie przeciwciało	Másodlagos ellenanyag
	Bufor zakwaszający	Savas puffer

	<u>Използвани символи</u>		
	Вижте инструкцията за работа		
	Температура на съхранение		
	Използвайте с		
LOT	Партиден код		
REF	Каталожен номер		
CONTROL	Контрол		
IVD	Ин витро диагностично медицинско изделие		
	Производител		
	Съдържание достатъчно за <n> теста		
WASH SOLN CONC	Концентриран измиващ разтвор		
CAL 0	Нулев калибратор		
CAL N	Калибратор #		
CONTROL N	Контрол #		
Ag 125I	Трейсър		
Ab 125I	Трейсър		
Ag 125I CONC	Концентриран маркер		
Ab 125I CONC	Концентриран маркер		
	Епруветки		
INC BUF	Инкубационен буфер		
ACETONITRILE	Ацетонитрил		
SERUM	Серум		
DIL SPE	Разредител за пробите		
DIL BUF	Буфер за разреждане		
ANTISERUM	Антисерум		
IMMUNOABSORBENT	Имуноабсорбент		
DIL CAL	Разредител за калибратора		
REC SOLN	Пресъздаващ разтвор		
PEG	Полиетилен гликол		
EXTR SOLN	Екстрактов разтвор		
ELU SOLN	Разтвор за елюиране		
GEL	Силикагелни пълнители		
PRE SOLN	Пред-лечебен разтвор		
NEUTR SOLN	Неутрализиращ ратвор		
TRACEUR BUF	Маркерен буфер		
UL	Микротитърна пластина		
Ab HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза		
Ag HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза		
Ab HRP CONC	HRP конюгиран концентрат		
Ag HRP CONC	HRP конюгиран концентрат		
CONJ BUF	Буфер за конюгата		
CHROM TMB CONC	Хромогенен TMB концентрат		
CHROM TMB	Хромогенен TMB разтвор		
SUB BUF	Субстратен буфер		
STOP SOLN	Стоп разтвор		
INC SER	Инкубационен серум		
BUF	Буфер		
Ab AP	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза		
SUB PNPP	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат		
BIOT CONJ CONC	Биотин конюгиран концентрат		
AVID HRP CONC	Авидин HRP концентрат		
ASS BUF	Буфер за пробите		
Ab BIOT	Биотин конюгат		
Ab	специфично анти тяло		
SAV HRP CONC	стрептавидин HRP концентрат		
NSB	не специфично свързване		
2nd Ab	второ анти тяло		
ACID BUF	киселинизиращ буфер		