



ANGIOTENSIN II-RIA

KIPERB320



ANGIOTENSIN II- RIA

en

KIPERB320

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

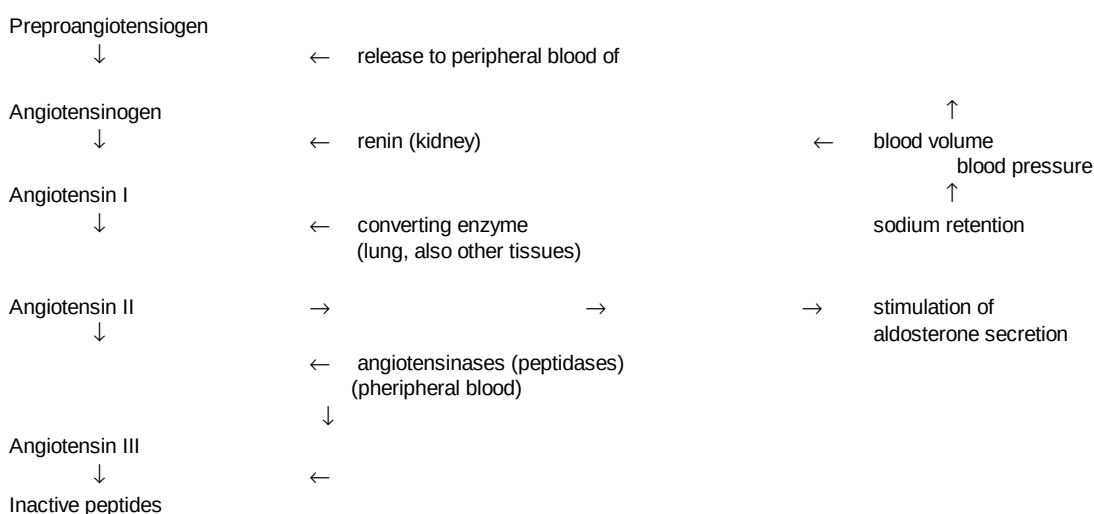
1 INTENDED USE

The DIAsource angiotensin II kit contains reagents and instructions for the quantitative measurement of angiotensin II in plasma. After extraction the angiotensin II concentrations are measured by radioimmunoassay (RIA). For professional use within a laboratory.

2 CLINICAL APPLICATION

Angiotensin II is the biologically active product of the renin-angiotensin system (1,2).

The octapeptide angiotensin II (molecular weight 1046) is the strongest physiological vasoconstrictor known. From a large protein precursor (pre-angiotensinogen) synthesized in the liver it is liberated in a series of proteolytic steps catalyzed by enzymes from various tissues (1, 2 4). Angiotensin II is very short-lived in the plasma: Once generated from angiotensin I, it is degraded further into physiologically inactive peptides by various plasma peptidases, at a plasma half life of less than a minute (5). The scheme below gives an outline of the so-called renin-angiotensin system:



Since the generation of angiotensin II from angiotensinogen via angiotensin I is strongly affected by changes of the renin activity, all external factors influencing renin activity are to be carefully considered: renin activity is elevated during pregnancy, after sodium depletion, in upright position, and under the influence of a range of drugs, e.g. oral contraceptives, adrenalin, antihypertensive vasodilators, diuretics, high doses of spirinolactone and progesterone. Factors decreasing renin activity are: horizontal position, increased sodium uptake, α-methyl-DOPA, L-DOPA, propranolol, reserpin, clonidin and old age. Renin activity is also subject to a diurnal rhythm with peak values in the morning.

The angiotensin II radioimmunoassay has its established application in the treatment and monitoring of hypertension.

3 PRINCIPLE OF TEST

After extraction of the plasma samples, angiotensin II is assayed by a competitive radioimmunoassay. This radioimmunoassay is using a rabbit anti-angiotensin II antiserum and a radio-iodinated angiotensin II tracer. Bound and free phases are separated by a second antibody bound to solid phase particles, followed by a centrifugation step. The radioactivity in the bound fractions is measured and a typical calibration curve can be generated.

4 PRECAUTIONS

1. Materials derived from human blood and used in the preparation of this kit were tested and found negative for hepatitis B surface antigen (HBsAg), antibodies to HCV and for antibodies to HIV-1 and HIV-2. However, handle all components as a possible source of infection.
2. The reagents in this kit contain sodium azide. Contact with copper or lead drain pipes may result in the cumulative formation of highly explosive azide deposits. On disposal of the reagents in the sewerage, always flush with copious amounts of water, which prevents metallic azide formation. Plumbing suspected of being contaminated with these explosive deposits should be cleaned thoroughly with 10% sodium hydroxide solution.
3. The radioactive material included may be received, acquired, possessed and used only by physicians, clinical laboratories or hospitals for in-vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulation of each country.

This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

Adherence to the basic rules of radiation safety should provide adequate protection.

- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where radioactive materials are used.
- Do not pipette radioactive solutions by mouth.
- Avoid direct contact with all radioactive materials by using protective articles such as lab coats and disposable gloves.
- All radiological work should be done in a designated area.
- Radioactive materials should be stored in original containers in a designated area.
- Laboratory equipment and glassware which are subject to contamination should be segregated to prevent cross-contamination of different radio-isotopes.
- Any radioactive spills should be taken care of immediately in accordance with established procedures.
- All radioactive materials must be disposed of in accordance with the prevailing regulations and guidelines of the agencies jurisdiction over the laboratory.

5 SPECIMEN COLLECTION

Careful standardization of the patient preparation and sampling conditions is recommended. Due to the extreme liability of angiotensin II in biological fluid much care must be taken to ensure that the blood sample is collected properly:

- draw blood from fasting patient in recumbent position into cold tube containing EDTA;
- centrifuge immediately at 4° C to separate the plasma;
- freeze the sample immediately in plastic tubes at -20° C until assayed.

6 MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED

Pipettes (100 µL, 200 µL, 400 µL, 1.00 mL, 2.00 mL, 5.00 mL)

Repeating dispensers (100 µL, 200 µL)

Measuring cylinder 25 mL

Polystyrene tubes, polypropylene or glass-tubes

Vortex

Refrigerated centrifuge

Ethanol p.A. 98%

Vac-concentrator or N₂ (nitrogen)

Ice bath

Gamma Counter

7 QUALITY CONTROL

Controls should be carried out in each assay run. Two controls are included in the kit, the value (without extraction procedure) is indicated on the Control sheet and the labels of the vials. Use controls as recommended by the control plasma manufacturer and in accordance with reference laboratories practice to monitor the accuracy and precision of reagents and techniques.

8 SHELF LIFE AND STORAGE

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified.

Upon receipt of the kit, all reagents should be stored at 2-8°C.

The reconstituted reagents should be stored according to table on section 10.

The reconstituted reagents are stable according to table on section 10, but no longer than to the expiry date.

9 KIT COMPONENTS

- | | | | | | | |
|------|---|---------|------------------|---------|---|--|
| 1. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>A</td><td>Ab</td></tr></table> | REAG | A | Ab | 1 vial, lyophilized anti-angiotensin II (Rabbit) for 100 tubes.
Colour : yellow. | |
| REAG | A | Ab | | | | |
| 2. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>B</td><td>Aq</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> | REAG | B | Aq | ¹²⁵ I | 1 vial, 56 KBq or 1.5 µCi. Lyophilized. Specific activity : 62-77 MBq/nmol (1700-2100 µCi/nmol).
Colour : blue. |
| REAG | B | Aq | ¹²⁵ I | | | |
| 3. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>C</td><td>DASP</td></tr></table> | REAG | C | DASP | 1 vial, goat anti-rabbit IgG's bound to solid phase.
11 mL suspension. | |
| REAG | C | DASP | | | | |
| 4. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>D</td><td>ASSAY</td><td>BUF</td></tr></table> | REAG | D | ASSAY | BUF | 2 vials, 0.05 M phosphate buffer with 0.25 % HSA, 0.25 % EDTA disodium salt, 0.05 % NaN ₃ , 500 KIU Trasylol/mL., pH 7.4., 2 x 50 mL (liquid) |
| REAG | D | ASSAY | BUF | | | |
| 5. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>E</td><td>CAL</td></tr></table> | REAG | E | CAL | 1 vial, 5.0 mL angiotensin II calibrator, 300 pmol/L. Lyophilized in assay buffer. | |
| REAG | E | CAL | | | | |
| 6. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>F</td><td>Control</td></tr></table> | REAG | F | Control | 1 vial, 2.0 mL lyophilized angiotensin II control, low level. | |
| REAG | F | Control | | | | |
| 7. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>G</td><td>Control</td></tr></table> | REAG | G | Control | 1 vial, 2.0 mL lyophilized angiotensin II control, high level. | |
| REAG | G | Control | | | | |

10 PREPARATION OF REAGENTS

(reconstitute 15 minutes before use)

Item	Reconstitute each vial with		Stable at	Special remarks
Anti-angiotensin II (Reagent A)	22 mL distilled water	Mix gently	-20° C for at least 3 months after recon- stitution	
¹²⁵ I-angiotensin II (Reagent B)	25 mL distilled water	Mix gently	-20° C until expiry date	
Double antibody solid phase (Reagent C)	Ready for use. The separation reagent should be placed on a magnetic stirrer for 10 minutes at room temp		2-8° C until expiry date	It is possible to pipette the reagent with a repeating dispenser
Assay buffer (Reagent D)	Ready for use		2-8° C until expiry date	
Angiotensin II calibrator 300 pmol/L (Reagent E)	5.00 mL distilled water	Mix gently	-20° C for at least 3 months after recon- stitution	Refer to table for calibration curve preparation
Angiotensin II low control (Reagent F)	2.00 mL distilled water	Mix gently	-20°C for at least 3 months after recon- stitution	The concentration of the control is found on the label of the vial and in the QC sheet (without extraction)
Angiotensin II high control (Reagent G)	2.00 mL distilled water	Mix gently	-20°C for at least 3 months after recon- stitution	The concentration of the control is found on the label of the vial and in the QC sheet (without extraction)

11 PERFORMANCE

A. Extraction procedure of plasma

- Label one extraction tube for each patient sample. Label one additional tube (R) in order to estimate the extraction recovery.
- Place the extraction tubes and ethanol on ice.
- Pipette 1.0 mL of each sample into the appropriately labelled extraction tubes.
DO NOT EXTRACT CALIBRATORS AND CONTROLS.
- Prepare a recovery estimation tube (R):
 - Pipette 1.0 mL of a random plasma sample into the recovery tube (R). The sample used for this recovery assay should have a protein matrix similar to the samples being tested.
 - Add 200 µL ¹²⁵I-angiotensin II tracer into two R tubes.
 - Extract this sample along with samples in step 6.
- Prepare Total Recovery tube (TR):
 - Pipette 200 µL ¹²⁵I-angiotensin II tracer into two TR tubes.
 - Add 200 µL assay buffer and mix.
 - Cap and set aside this tube to be counted for recovery calculation.
- Add 4 mL chilled ethanol to each sample and Recovery tube (R).
- Mix and vortex for 2 minutes.
- Centrifuge all extraction tubes at 2000 g. for 15 minues at 2-8°C.
- Decant supernatant from each extraction tube into previous prepared clean, appropriately labelled 16 x 100 mm tubes.
- Evaporate the supernatants under a stream of nitrogen to dryness (at max. 37°C).
- Reconstitute the dried samples by adding 1.0 mL assay buffer and vortex thoroughly.
- Proceed RIA procedure immediately or store the extracted samples at -20°C up to two weeks before using it in the assay.
- Reconstitute the dried recovery sample (R) by adding 1.0 mL assay buffer and vortex thoroughly.
- Pipette 400 µL of the reconstituted recovery sample tube (R) into two 12 x 75 mm tubes.
- Count the total recovery (TR) and recovery (R) tubes for at least two minutes in a gamma counter.

Recovery calculation

Calculate % recovery by dividing the cpm in the recovery tubes (R) by cpm in the total recovery tubes (TR) and multiply by 1.0/0.4:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{cpm recovery tube}}{\text{cpm total recovery tube}} \times 100$$

B. Preparation of calibrator solutions

TABLE FOR PREPARATION OF CALIBRATOR SOLUTIONS		
Dilution	Reagent E	Concentration 300 pmol/L
1000 µL of Reagent E + 1000 µL assay buffer vortex	calibrator a	150 pmol/L
1000 µL of calibrator a + 1000 µL assay buffer Vortex	calibrator b	75 pmol/L
1000 µL of calibrator b + 1000 µL assay buffer Vortex	calibrator c	37.5 pmol/L
1000 µL of calibrator c + 1000 µL assay buffer Vortex	calibrator d	18.8 pmol/L
1000 µL of calibrator d + 1000 µL assay buffer Vortex	calibrator e	9.4 pmol/L
1000 µL of calibrator e + 1000 µL assay buffer vortex	calibrator f	4.7 pmol/L

C. Assay Procedure

- Keep assay tubes and reagents in an ice bath during all pipetting steps.
- Pipette 400 µL of each calibrator, 400 µL of controls and 400 µL of each plasma extract in duplicate into the corresponding labelled polystyrene tubes.
- Add 400 µL of assay buffer (Reagent D) to the max. binding tubes (0 pmol/L).
- Add 600 µL of assay buffer to the NSB (blank) tubes.
- Add 200 µL of angiotensin II antiserum (Reagent A) to each tube, except blank and TC-tubes.
- Vortex and incubate for 6 hours at 4° C.
- Add 200 µL of ¹²⁵I-Angiotensin II tracer (Reagent B) to all tubes.
- Vortex all tubes and incubate at 4° C for 18-22 hours.
- While stirring continuously add 100 µL of the double antibody solid phase (Reagent C) to all tubes, except TC- tubes.
- Vortex and incubate 30-60 minutes at 4° C.
- Centrifuge all tubes for 15 minutes at 1700 g at 4° C or room temperature.
- Decant the supernatants carefully.
- Count residue for 1-2 minutes.

	Assay buffer (D)	Calibrator or sample or contr.	Anti- angiotensin II antiserum (A)	¹²⁵ I-angiotensin II (B)	Separation reagent (C)	
Total Counts (TC)	-	-	-	200 µL	-	Vortex and
Blank (NSB)	600 µL	-	-	200 µL	100 µL	centrifuge
St. 0 pmol/L	400 µL	-	200 µL	200 µL	100 µL	for 15
St. 4.7 pmol/L	-	400 µL	200 µL	200 µL	100 µL	minutes at
St. 9.4 pmol/L	-	400 µL	200 µL	200 µL	100 µL	1700 g at
St. 18.8 pmol/L	-	400 µL	200 µL	200 µL	100 µL	+4° C.
St. 37.5 pmol/L	-	400 µL	200 µL	200 µL	100 µL	Aspirate or
St. 75 pmol/L	-	400 µL	200 µL	200 µL	100 µL	decant the
St. 150 pmol/L	-	400 µL	200 µL	200 µL	100 µL	supernatant.
controls	-	400 µL	200 µL	200 µL	100 µL	Count the
Unknown sample	-	400 µL	200 µL	200 µL	100 µL	residue for 1-2 minutes.

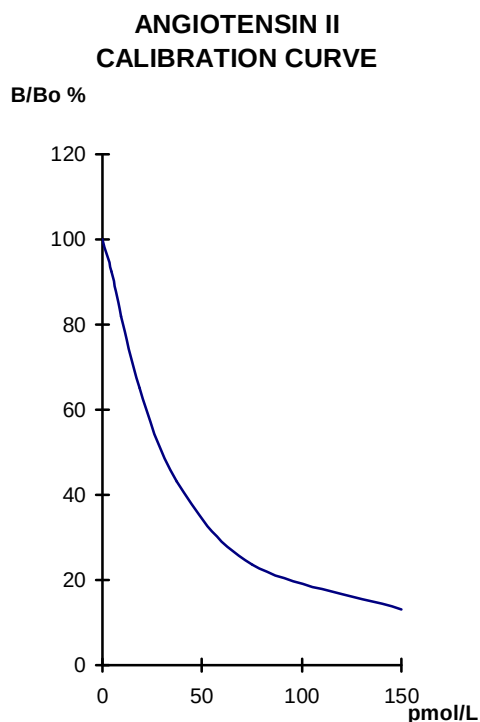
D. Calculation of test results

1. Subtract the mean count rate (cpm) of the NSB from the mean count rate (cpm) of the replicates of calibrators, controls and patient samples.
2. A calibration curve can be generated by plotting cpm, % B/Bo or %B/T of precipitated bound fraction, against the concentration of the angiotensin II calibrators.
3. To obtain the angiotensin II concentration in the extracted patient samples and controls, their cpm, % B/Bo or B/T of precipitated bound fractions are interpolated now from generated calibration curve.
4. The calibration curve can also be constructed by computer methods. For automated data reduction, logit/log can be used.
5. Correct plasma values for % extraction recovery.

E. Calibration Curve Data

	Average cpm	Corrected cpm	% B/Bo	Results (pmol/L)
Total counts	18582			
NSB	678			
Calibrator	0 pmol/L	9559	100	
Calibrator f	4.7 pmol/L	8880	92.4	
Calibrator e	9.4 pmol/L	7957	82.0	
Calibrator d	18.8 pmol/L	7039	65.1	
Calibrator c	37.5 pmol/L	4508	43.1	
Calibrator b	75 pmol/L	2770	23.6	
Calibrator a	150 pmol/L	1846	13.1	
Control low	7359	6681	75.2	13.1
Control high	3145	2467	27.8	63.1

F. Example of Calibration Curve



12. PERFORMANCE

12.1 Sensitivity

The sensitivity judged as 3 standard deviations change from zero calibrator is 2.0 pmol/L

12.2 Precision										
Within-run						Between-run				
	n	mean pmol/L	SD	% c.v.			n	mean pmol/L	SD	% c.v.
sample A	20	13.3	0.44	3.3		sample A	6	11.6	0.55	4.8
sample B	20	64.9	1.97	3.0		sample B	6	60.9	2.4	3.9

12.3 Recovery			
Four different samples are spiked with different amounts of angiotensin II calibrator			
Sample	Expected conc. (pmol/L)	Observed conc. (pmol/L)	% Recovery
A1	12.4	12.3	99.2
A2	23.9	23.5	96.8
A3	27.2	22.0	103.0
A4	46.0	51.1	111.0

12.4 Specificity

Angiotensin II antiserum is raised in rabbits. The following cross-reactivities were measured at 50% B/Bo.

Peptide	Cross-reaction
Angiotensin II	100 %
Angiotensin I	<0.1 %
Leu-Heptapeptide	100 %
Asn ¹ -Val ⁵ Angiotensin II	30 %
Sar ¹ Ile ⁸ Angiotensin II	100 %
Angiotensin III	80 %

12.5 Normal range

Each laboratory should establish its own normal range of expected values. Blood samples were drawn from 11 apparently healthy adults (09.00 - 10.00 a.m.) and Angiotensin II levels were determined.

Observed Range: 19 - 38 pmol/L

13 REFERENCES

S. Oparil, E. Haber, N. Engl. J. Med. 291, 389-401, 446-457 (1974).

W.F. Ganong.
Review of Medical Physiology, 6th ed., 342-344 (1973).
Lange Medical Publications, Los Althos, CA.

J. Voigt, B. Wittmann-Liebold, H. Köster.
Eur. J. Biochem, 122, 183-191 (1982).

O. Ganten, J.L. Minnich, P. Granger, K.Hayduk, H.M. Brecht, A. Barbeau, R. Boucher, J. Genest, Science 173, 64-65 (1971).

A. Leaf, G.W. Liddle, in
"Textbook of Endocrinology" p. 938 ed. R.H. Williams,
W.B. Saunders Co., Philadelphia (1974).

A. Saye.
Hypertension, 216-221 (1983).

V.J. Dzan.
Circulation 77 (Suppl 1.1) (1988).

Ch. Klett.
Clin. Exp. Hypert. 9, 2027-2047 (1987).

J.F.E. Mann.
Clin. Exp. Hypert. 10, 151-168 (1988).

J.J. Morton.
D.J. Webb, Clinical Science 68, 482-484 (1985).

Revision date : 2009-06-08



ANGIOTENSIN II- RIA

de

KIPERB320

IN-VITRO-DIAGNOSTIKUM

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 ZWECKBESTIMMUNG

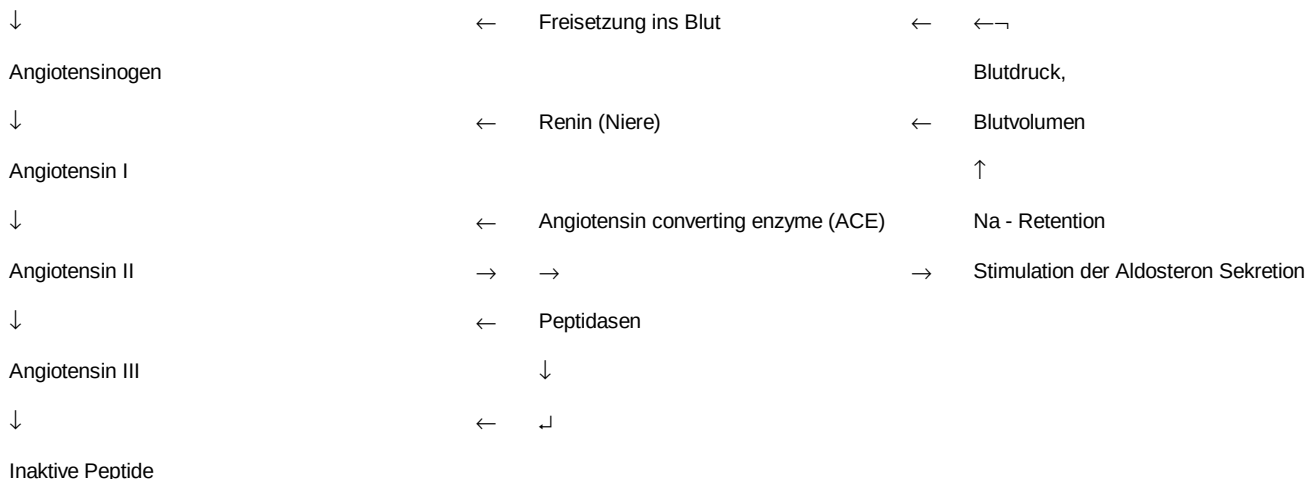
Der DIAsource Angiotensin II Kit enthält Reagenzien und eine Anleitung für die quantitative Bestimmung von Angiotensin II in Plasma. Nach einer Extraktion wird die Angiotensin II-Konzentration in einem Radioimmunoassay (RIA) bestimmt.
Für den professionellen Gebrauch im medizinisch-diagnostischen Labor.

2 KLINISCHE ANWENDUNG

Angiotensin II ist das biologisch aktive Produkt des Renin - Angiotensin Systems (1,2).

Das Oktapeptid Angiotensin II, mit einem Molekulargewicht von 1046 Dalton, ist der stärkste bekannte Vasokonstriktor. In der Leber wird eine hochmolekulare Vorstufe (Pre - Pro - Angiotensinogen) synthetisiert. Aus dieser wird im Plasma in mehreren proteolytischen Schritten Angiotensin II freigesetzt, katalysiert durch Enzyme von verschiedenen Geweben (1, 2, 4). Die Halbwertszeit von Angiotensin II im Plasma beträgt nur Minuten. Nach der Freisetzung aus Angiotensin I wird es sehr schnell durch verschiedene Peptidasen in biologisch inaktive Peptide gespalten (5). In der Abbildung ist das sogenannte Renin - Angiotensin schematisch dargestellt.

Pre - Pro - Angiotensinogen



Da die Bildung von Angiotensin II aus Angiotensinogen über Angiotensin I stark von der Reninaktivität beeinflusst wird, müssen auch alle externen Faktoren, die die Reninaktivität beeinflussen, mitberücksichtigt werden.

Folgende Faktoren führen zu einer Erhöhung der Reninaktivität:

- Schwangerschaft
- Na - Verlust
- Verschiedene Medikamente wie
- Orale Kontrazeptiva, Diuretika, Blutdrucksenkende Mittel, hohe Dosen Spironolacton und Progesteron, Adrenalin
- Zu einer verringerten Reninaktivität führen:
- Erhöhte Na - Aufnahme
- Methyl - Dopa
- L - Dopa
- Reserpin
- Clonidin

Ferner unterliegt die Reninaktivität einem circadianen Rhythmus mit einem morgentlichen Maximum.

Der Angiotensin II Radioimmunoassay wird zur Überwachung der Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt.

3 TESTPRINZIP

Nach einer Extraktion der Plasmaproben wird Angiotensin II mittels eines kompetitiven Radioimmunoassay bestimmt. Das Prinzip dieses Radioimmunoassays basiert auf der Konkurrenz zwischen ¹²⁵I-markiertem Angiotensin II und dem Angiotensin II aus den Standards bzw. der Probe um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen.

Nach der Inkubation ist die Menge an markierten Angiotensin II - Antikörper Komplexen umgekehrt proportional der Menge an unmarkiertem Angiotensin II in den Proben. Zur Abtrennung von Antikörper-gebundenem und freiem ¹²⁵I- Angiotensin II wird ein Anti-Antikörper im Überschuß zugegeben. Der Anti-Antikörper-Antikörper-Antigen-Komplex wird durch Zentrifugation pelletiert, ungebundenes Antigen wird dekantiert und die Radioaktivität im Pellet bestimmt.

4 VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur zum in vitro Gebrauch.

Es ist notwendig, dass die für das Labor verantwortliche Person mit den im jeweiligen Land gültigen, gesetzlichen Bestimmungen im Umgang mit radioaktivem Material vertraut ist.

Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanes Material enthalten, ergaben bei der Prüfung auf HCV, HBsAg bzw. Antikörper gegen HIV I/II-Virus ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

Es sollten geeignete Maßnahmen zum sicheren Umgang mit dem radioaktiven Material ergriffen werden. Nur autorisierte Personen sollten Zugang zu den Reagenzien haben.

Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

Die folgenden Vorsichtsmaßnahmen sollten beim Umgang mit radioaktivem Material beachtet werden:

- Radioaktives Material muß in speziell ausgewiesenen Räumen gelagert werden, die für nicht autorisiertes Personal nicht zugänglich sind.
- Der Umgang mit radioaktivem Material darf nur in speziell gekennzeichneten Räumen erfolgen.
- Vorsicht ist geboten vor oraler oder dermaler Aufnahme von radioaktiven Stoffen oder Kontamination von Kleidung. Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Bei der Testdurchführung darf weder gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Es wird empfohlen Einmalhandschuhe zu tragen. Nach Gebrauch radioaktiven Materials Hände waschen.
- Beim Umgang mit radioaktivem Material sollten die Labortische mit absorbierendem, wegwerfbarem Material abgedeckt sein.
- Verschüttetes radioaktives Material sollte sofort aufgenommen werden und kontaminiertes Material als radioaktiver Abfall entsorgt werden. Kontaminierte Tischoberflächen sollten mit einem Detergenz gesäubert werden.

Kitkomponenten enthalten Natriumazid. Kontakt mit Kupfer- oder Bleirohren kann zur Bildung von hochexplosiven Ablagerungen führen. Daher beim Einbringen in Abflüsse mit reichlich Wasser nachspülen, was die Bildung von Metallaziden verhindert. Rohre, die wahrscheinlich diese explosiven Ablagerungen enthalten vorsichtig mit 10%iger Natronlauge spülen.

5 PROBENGEWINNUNG

Sorgfältige Standardisierung der Probenentnahme ist unbedingt erforderlich. Bedingt durch die extreme Labilität von Angiotensin II in biologischen Flüssigkeiten muß bei der Probenentnahme folgendes beachtet werden:

- Blutentnahme von ruhenden, nüchternen Patienten soll in vorgekühlte EDTA - Röhrchen erfolgen.
- Sofortige Zentrifugation der Proben in einer Kühlzentrifuge zur Plasmagewinnung
- Proben sofort bei - 20 °C bis zur Analyse tiefgefrieren.

6 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

Pipetten mit Einmalspitzen, 100, 200, 400 µL und 1,00, 2,00 und 5,00 ml
Eppendorf-Multipipette für Volumina 100 und 200 µl
Meßzylinder 25 ml
Einmal-Teströhrchen, Polystyrol, Polypropylen oder Glas
Volumenpipette, 1,00 ml
Vortexmixer
Zentrifuge (vorzugsweise Kühlzentrifuge)
Ethanol p.A., 98%
Vakuum-Ausrüstung oder Stickstoffgas
Eisbad
Gammazähler

7 QUALITÄTSKONTROLLE

Kontrollen sollten mit jedem Lauf mitgemessen werden. Im Kit sind zwei Kontrollen enthalten. Die Werte (ohne Extraktionsverfahren) sind auf dem beiliegenden QC-Zertifikat sowie auf den Etiketten der Fläschchen angegeben. Die Kontrollen sollten gemäß den Empfehlungen der Kontrollplasmahersteller und in Übereinstimmung mit der Guten Laborpraxis angewendet werden, um die Richtigkeit und Präzision der Reagenzien und der Technik zu überwachen.

8 LAUFZEIT UND LAGERUNG

Dieser Kit ist haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum, wenn er unter den angegebenen Bedingungen gelagert wird. Nach dem Empfang sollten alle Reagenzien bei 2-8 °C gelagert werden.

Die rekonstituierten Reagenzien sollten gelagert werden wie in der Tabelle auf Abschnitt 10 angegeben. Die Haltbarkeit der rekonstituierten Reagenzien ergibt sich ebenfalls aus der Tabelle auf Abschnitt 10, überschreitet aber nicht das Verfallsdatum des Kits.

9 KOMPONENTEN DES KITS

1.	REAG	A	Ab
2.	REAG	B	Ag ^{125}I

1 Gefäß, Lyophilisiert. Anti-Angiotensin II (Kaninchen) für 100 Röhrchen.
Farbe: Gelb.

1 Gefäß, 56 KBq bzw. 1.5 µCi. Lyophilisiert. Spezifische Aktivität: 62-77 MBq/nmol (1700-2100 µCi/nmol).
Farbe: Blau.

3.

REAG	C	DASP
------	---	------

 1 Gefäß, Ziege anti-Kaninchen IgG, an Festphase gebunden.
11 mL Suspension.
4.

REAG	D	ASSAY	BUF
------	---	-------	-----

 2 Gefäße, 0,05 M Phosphatpuffer mit 0,25 % HSA, 0,25 % EDTA Dinatriumsalz,
0,05 % NaN₃, 500 KIU Trasylol/mL., pH 7,4., 2 x 50 mL (flüssig)
5.

REAG	E	CAL
------	---	-----

 1 Gefäß, 5,0 mL Angiotensin II Kalibrator, 300 pmol/L. Lyophilisiert in Assaypuffer.
6.

REAG	F	Control
------	---	---------

 1 Gefäß, 2,0 mL Lyophilisiert. Angiotensin II Kontrolle, niedriger Level.
7.

REAG	G	Control
------	---	---------

 1 Gefäß, 2,0 mL Lyophilisiert. Angiotensin II Kontrolle, hoher Level.

10 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

(15 Minuten vor Gebrauch herstellen.)

Komponente	Jedes Fläschchen rekonstituieren mit:		Haltbar bei:	Bemerkungen
Anti-Angiotensin II (Reagenz A)	22 mL bidest. Wasser	Vorsichtig mischen.	-20° C für mind. 3 Monate nach Rekonstitution.	
¹²⁵ I-Angiotensin II (Reagenz B)	25 mL bidest. Wasser	Vorsichtig mischen.	-20° C bis zum Verfallsdatum.	
Doppel-Antikörper-Festphase (Reagenz C)	Gebrauchsfertig. Das Trennreagenz sollte 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gerührt werden.		2-8° C bis zum Verfallsdatum.	Kann mit einer Wiederholpipette pipettiert werden.
Assaypuffer (Reagenz D)	Gebrauchsfertig.		2-8° C bis zum Verfallsdatum.	
Angiotensin II Kalibrator 300 pmol/L (Reagenz E)	5,00 mL bidest. Wasser	Vorsichtig mischen.	-20° C für mind. 3 Monate nach Rekonstitution.	Siehe Kalibrationskurve.
Angiotensin II Niedrige Kontrolle (Reagenz F)	2,00 mL bidest. Wasser	Vorsichtig mischen.	-20° C für mind. 3 Monate nach Rekonstitution.	Die Konzentration ist auf dem Etikett des Fläschchens und auf dem QC-Zertifikat angegeben (ohne Extraktion).
Angiotensin II Hohe Kontrolle (Reagenz G)	2,00 mL bidest. Wasser	Vorsichtig mischen.	-20° C für mind. 3 Monate nach Rekonstitution.	Die Konzentration ist auf dem Etikett des Fläschchens und auf dem QC-Zertifikat angegeben (ohne Extraktion).

11 TESTDURCHFÜHRUNG

A Extraktion der Plasmaproben

- Beschriftung der benötigten Röhrchen, extra Röhrchen für Wiederfindung
- Röhrchen und Ethanol auf Eis stellen
- Je 1 ml Probe in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.
KALIBRATOREN UND KONTROLLEN NICHT EXTRAHIEREN.
- Wiederfindung abschätzen (R):
1 ml einer Plasmaprobe in das entsprechende Röhrchen (R) pipettieren. Die Probe sollte eine ähnliche Proteinmatrix wie die zu analysieren den Proben aufweisen.
200 µl ¹²⁵I - Angiotensin II Tracer in das Röhrchen zur Wiederfindung pipettieren.
Wiederfindungsprobe wie Analysenproben extrahieren (siehe 6.)
- Zur Bestimmung der Gesamtaktivität (TR) werden 2 Röhrchen beschriftet, 200 µl ¹²⁵I - Angiotensin II Tracer in die Röhrchen pipettiert, mit 200 µl Assaypuffer versetzt und beiseite gestellt.
- Je 4 ml kalten Ethanol in alle Röhrchen (nicht in TR) pipettieren
- 2 Minuten auf einem Vortexer mischen.
- Zentrifugation der Proben bei 2000 x g, 2 - 8 °C, für 15 Minuten.
- Überstände der extrahierten Proben in saubere Röhrchen überführen.
- Überstände unter Stickstoffstrom zur Trockne eindampfen (max. 37 °C).
- Rekonstitution der eingedampften Proben mit 1 ml Assaypuffer (kräftig vortexen).
- Proben direkt im RIA weiterverarbeiten, oder bei - 20 °C bis zu zwei Wochen lagern.
- Rekonstitution der getrockneten Wiederfindungsprobe (R) mit 1 ml Assaypuffer (kräftig vortexen).

14. 400 µl der rekonstituierten Wiederfindungsprobe (R) in zwei neue 12 x 75 mm-Röhrchen pipettieren.
15. Totalaktivität (TR) und Wiederfindung (R) für mind. 2 Minuten in einem Gammacounter messen.

Berechnung der Wiederfindungsrate:

Zur Berechnung der Prozent Wiederfindung werden die cpm der Wiederfindungsprobe (R) durch die cpm der Gesamtaktivität (TR) dividiert und mit 1/0,4 multipliziert.

$$\% \text{ Wiederfindung} = \frac{\text{cpm Wiederfindungsprobe (R)}}{\text{cpm Gesamtaktivität (TR)}} \times \frac{1,0}{0,4} \times 100$$

B. Herstellung der Kalibratorverdünnungen

TABELLE ZUR HERSTELLUNG DER STANDARDLÖSUNGEN		
Verdünnung	Reagenz E	Konzentration 300 pmol/L
1000 µL Reagenz E + 1000 µL Assaypuffer Vortexen.	Kalibrator A	150 pmol/L
1000 µL Kalibrator A + 1000 µL Assaypuffer Vortexen.	Kalibrator B	75 pmol/L
1000 µL Kalibrator B + 1000 µL Assaypuffer Vortexen	Kalibrator C	37.5 pmol/L
1000 µL Kalibrator c + 1000 µL Assaypuffer Vortexen	Kalibrator D	18.8 pmol/L
1000 µL Kalibrator D + 1000 µL Assaypuffer Vortexen	Kalibrator E	9.4 pmol/L
1000 µL Kalibrator E + 1000 µL Assaypuffer Vortexen.	Kalibrator F	4.7 pmol/L

C Testdurchführung

Alle Röhrchen und Reagenzien während der Pipettierschritte auf Eis stellen.

1. 400 µl von jedem Kalibratoren, jeder Kontrollen und jeder extrahierten Proben in die entsprechend gekennzeichneten Polystyrenröhrchen pipettieren (Doppelbestimmungen).
2. 400 µl Assaypuffer (Reagenz D) in die Röhrchen für maximale Bindung (0 pmol/l) pipettieren
3. 600 µl Assaypuffer in die Röhrchen für NSB (nicht spezifische Bindung) pipettieren.
3. 200 µl Angiotensin II-Antiserum (Reagenz A) in alle Röhrchen (Ausnahme NSB und Totalaktivität TA) pipettieren, vortexen.
4. Inkubation für 6 Stunden bei 4 °C.
5. 200 µl ¹²⁵I-Angiotensin II Tracer (Reagenz B) in alle Röhrchen geben (auch in TA), vortexen.
6. Inkubation für 18 - 22 Stunden bei 4 °C.
7. 100 µl Doppel-Antikörper-Festphase (Reagenz C) in alle Röhrchen (Ausnahme TA) pipettieren (während des Pipettierens permanent rühren). Vortexen.
8. Inkubation für 30 - 60 Minuten bei 4 °C.
9. Röhrchen für 15 Minuten bei 1700 x g und 4 °C oder Raumtemperatur zentrifugieren.
10. Überstand dekantieren.
11. Radioaktivität des Sediments mindestens 1 Minute im Gammazähler messen.

	Assay- puffer (D)	KalibratorP robe oder Kontrolle	Anti- Angiotensin II Antiserum (A)		¹²⁵ I-Angiotensin II (B)		Trennreagenz (C)	
Totalaktivität (TA)	-	-	-	Vortexen	200 µL	Vortexen	-	Vortexen und
Blank (NSB)	600 µL	-	-	und 6	200 µL	und 18-22	100 µL	und 30-60
St. 0 pmol/L	400 µL	-	200 µL	Stunden	200 µL	Stunden	100 µL	Minuten
St. 4.7 pmol/L	-	400 µL	200 µL	bei +4° C	200 µL	bei +4° C	100 µL	bei +4° C
St. 9.4 pmol/L	-	400 µL	200 µL	inku- bieren.	200 µL	inkubieren.	100 µL	inku- bieren.
St. 18.8 pmol/L	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL	
St. 37.5 pmol/L	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL	
St. 75 pmol/L	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL	
St. 150 pmol/L	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL	
Kontrollen	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL	
Proben	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL	

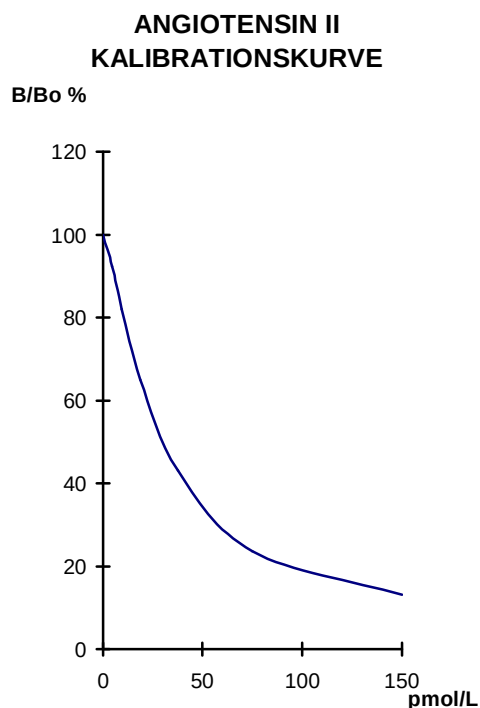
D. Testauswertung

1. Die mittleren Counts (cpm) der NSB-Tubes von den mittleren Counts (cpm) der Kalibratoren, Kontrollen und Patientenproben subtrahieren.
2. Die Kalibrationskurve kann mit den cpm, % B/Bo oder %B/T des Präzipitats gegen die Konzentration der Angiotensin II Kalibratoren aufgestellt werden.
3. Die Angiotensin II-Konzentration der extrahierten Patientenproben und der Kontrollen kann anhand der Kalibrationskurve abgelesen werden.
4. Die Kalibrationskurve kann auch mit Computer-basierten Methoden berechnet werden. Logit/log und Spline-Methoden können verwendet werden.
5. Die Plasmawerte müssen anhand der Wiederfindung der Extraktion korrigiert werden.

E. Daten einer Standardkurve

		Mittlere cpm	Korrigierte cpm	% B/Bo	Ergebnis (pmol/l)
Totalaktivität		18582			
NSB		678			
Standard	0 pmol/L	9559	8881	100	
Kalibrator F	4.7 pmol/L	8880	8202	92,4	
Kalibrator E	9.4 pmol/L	7957	7279	82,0	
Kalibrator D	18.8 pmol/L	7039	5781	65,1	
Kalibrator C	37.5 pmol/L	4508	3830	43,1	
Kalibrator B	75 pmol/L	2770	2099	23,6	
Kalibrator A	150 pmol/L	1846	1168	13,1	
Niedrige Kontrolle		7359	6681	75,2	13,1
Hohe Kontrolle		3145	2467	27,8	63,1

F. Beispiel einer Kalibrationskurve



12 TESTCHARAKTERISTIKA

12.1 Sensitivität

Die Sensitivität, definiert als 3fache Standardabweichung vom Nullkalibrator, wurde mit 2,0 pmol/l ermittelt.

12.2 Präzision									
Intra-Assay					Inter-Assay				
	n	Mittlere pmol/L	SD	% VK		n	Mittlere pmol/L	SD	% VK.
Probe A	20	13,3	0,44	3,3	Probe A	6	11,6	0,55	4,8
Probe B	20	64,9	1,97	3,0	Probe B	6	60,9	2,4	3,9

12.3 Wiederfindung 4 verschiedene Proben wurden mit unterschiedlichen Mengen Angiotensin II versetzt und erneut analysiert.			
Probe	Erwartet (pmol/l)	Gemessen (pmol/l)	% Wiederfindung
A1	12.4	12.3	99.2
A2	23.9	23.5	96.8
A3	27.2	22.0	103.0
A4	46.0	51.1	111.0

12.4 Spezifität

Das Angiotensin II Antiserum wurde in Kaninchen angereichert. Folgende Kreuzreaktivitäten wurden gemessen 50 B/Bo.

<u>Peptid</u>	<u>% Kreuzreaktivität</u>
Angiotensin II	100
Angiotensin I	<0.1
Leu-Heptapeptid	100
Asn ¹ -Val ⁵ Angiotensin II	30
Sar ¹ Ile ⁸ Angiotensin II	100
Angiotensin III	80

13 NORMALWERTEBEREICH

Die aufgeführten Referenzbereiche dienen lediglich als Anhaltswerte. Jedem Labor wird empfohlen, seine eigenen Normbereiche festzulegen. Die Blutproben stammen von 11 normalen Blutspendern.

Plasma: (9:00-10:00 Uhr) 19 - 38 pmol/l

14 LITERATUR

1. S. Oparil, E. Haber, N. Engl. J. Med. 291, 389-401, 446-457 (1974).
2. W.F. Ganong.
Review of Medical Physiology, 6th ed., 342-344 (1973).
Lange Medical Publications, Los Althos, CA.
3. J. Voigt, B. Wittmann-Liebold, H. Köster.
Eur. J. Biochem, 122, 183-191 (1982).
4. O. Ganten, J.L. Minnich, P. Granger, K.Hayduk, H.M. Brecht, A. Barbeau, R. Boucher, J. Genest, Science 173, 64-65 (1971).
5. A. Leaf, G.W. Liddle, in
"Textbook of Endocrinology" p. 938 ed. R.H. Williams,
W.B. Saunders Co., Philadelphia (1974).
6. A. Saye.
Hypertension, 216-221 (1983).
7. V.J. Dzan.
Circulation 77 (Suppl 1.1) (1988).
8. Ch. Klett.
Clin. Exp. Hypert. 9, 2027-2047 (1987).
9. J.F.E. Mann.
Clin. Exp. Hypert. 10, 151-168 (1988).
10. J.J. Morton.
D.J. Webb, Clinical Science 68, 482-484 (1985).

Revisionsdatum: 2009-06-08



ANGIOTENSIN II- RIA

it

KIPERB320

DISPOSITIVO DIAGNOSTICO IN VITRO

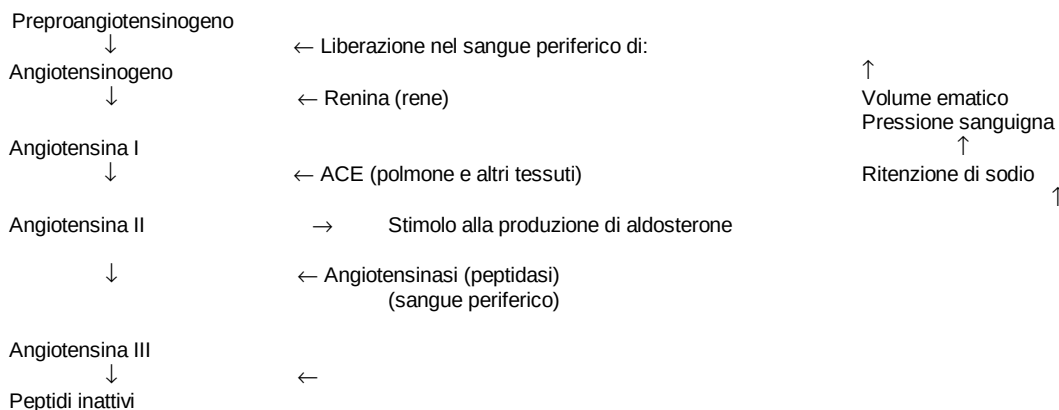
DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 INTRODUZIONE

Il kit DIAsource Angiotensina II contiene reattivi e istruzioni per eseguire la determinazione quantitativa dell'angiotensina II nel plasma. Dopo l'estrazione la concentrazione di angiotensina viene misurata con un metodo radioimmunologico (RIA).
Per uso professionale in laboratorio

2 CONSIDERAZIONI CLINICHE

L'angiotensina II è la molecola biologicamente attiva prodotta dal sistema renina-angiotensina (1, 2). L'octapeptide angiotensina II (peso molecolare 1046 dalton) è la molecola conosciuta con maggiore attività vasocostrittrice; viene liberata per successivi passaggi proteolitici catalizzati da enzimi presenti in alcuni tessuti da un largo precursore proteico (pre-proangiotensinogeno) sintetizzato nel fegato (1, 2, 4). L'angiotensina II ha emivita molto breve nel plasma: dopo liberazione da angiotensina I è subito degradata a peptidi fisiologicamente attivi da peptidasi presenti nel plasma, per una emivita plasmatica inferiore a 5 minuti (5). Lo schema riportato più in basso rappresenta il cosiddetto sistema renina-angiotensina:



Poiché la generazione di angiotensina II dall'angiotensinogeno via angiotensina I è influenzata dalle modificazioni dell'attività reninica, devono essere attentamente considerati tutti i fattori esterni che ne possano influenzare l'attività: l'attività reninica è elevata in gravidanza, nell'iponatremia, in ortostatismo e dopo l'assunzione di alcuni farmaci come contraccettivi orali, adrenalina, anti ipertensivi vasodilatatori, diuretici e dopo dosi elevate di spironolattone e progesterone. I fattori che ne diminuiscono l'attività sono: clinostatismo, aumentata assunzione di sodio, α -metil DOPA, L-DOPA, propranololo, reserpina, clonidina e l'età avanzata. L'attività reninica è anche soggetta ad un ritmo circadiano con valori leggermente più elevati al mattino.

Il dosaggio radioimmunologico dell'angiotensina II è utilizzato nel trattamento e nel controllo dell'ipertensione.

3 PRINCIPIO DEL METODO

Dopo l'estrazione dal plasma, l'angiotensina II viene dosata con un metodo radioimmunologico competitivo che utilizza un anticorpo di coniglio diretto contro l'angiotensina II e angiotensina II marcata con ^{125}I . Dopo l'incubazione, il marcato legato all'anticorpo viene precipitato con l'aggiunta di un secondo anticorpo legato a cellulosa. Le provette vengono quindi centrifugate, decantate e contate con un contatore gamma; la concentrazione di angiotensina II nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

4 PRECAUZIONI

1. Alcuni reattivi presenti nel kit sono di origine umana e si sono rivelati negativi per HIV1 e HIV2, HBV e HCV. Questi reattivi devono essere manipolati come in grado di trasmettere malattie infettive. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che questi o altri agenti infettivi siano assenti. Manipolare questi reattivi come potenziali fonti di infezioni. Manipolare tutti i campioni di sangue come potenziali fonti di infezioni.
2. Alcuni reattivi contengono sodio azide come conservante, che può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosivi. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi. Le tubature eventualmente interessate da questi depositi esplosivi devono essere lavate con una soluzione di idrossido di sodio 10 %.
3. L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione.

Il kit contiene ^{125}I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.

Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

- Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici.
- Non pipettare materiale radioattivo con pipette a bocca.
- Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo.
- I banchi da lavoro devono essere sempre coperti con carta assorbente monouso.
- Il materiale radioattivo eventualmente disperso nell'ambiente di lavoro deve essere immediatamente asportato con carta assorbente che deve poi essere eliminata nei contenitori per rifiuti radioattivi solidi. Le superfici interessate devono essere lavate con un liquido decontaminante adeguato.

5 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Si raccomanda di standardizzare la preparazione dei pazienti e le condizioni di raccolta dei campioni.

Poiché l'angiotensina II nei liquidi biologici non è stabile, controllare accuratamente le modalità di raccolta dei campioni:

- prelevare il sangue da pazienti a digiuno in clinostatismo e trasferirlo in provette con EDTA come anticoagulante mantenute in bagno di acqua e ghiaccio;
- separare immediatamente per centrifugazione a 4°C il plasma dalla parte corpuscolata;
- trasferire immediatamente il plasma in provette di plastica e conservarlo a -20°C fino al momento del dosaggio.

6 MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio, è richiesto il materiale seguente:

Micropipette di precisione con puntali monouso (100, 200, 400 e 1000 µL)

Pipette da 2 e 5 mL

Micropipette semiautomatiche 100 e 200 µL

Cilindro da 25 mL

Provette in polistirene, polipropilene o vetro

Agitatore tipo Vortex

Centrifuga refrigerata (min. 1700 x g)

Etanolo PA 98%

Evaporatore centrifugo o sistema di evaporazione in corrente d'azoto

Bagno di acqua e ghiaccio

Sistema di aspirazione o decantazione

Contatore gamma

7 CONTROLLO DI QUALITÀ

Utilizzare sempre i controlli. Con kit sono forniti 2 controlli che non devono essere estratti e i cui valori sono riportati sul foglio del controllo di qualità e sulle etichette dei rispettivi flaconi. Utilizzare i controlli come indicato dal produttore e per verificare l'accuratezza e la precisione dei reattivi e dell'attrezzatura di laboratorio.

8 PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REATTIVI

Il kit è stabile fino alla data riportata sulla confezione se conservato come prescritto.

Conservare i reattivi prima della ricostituzione a 2-8°C. I reattivi ricostituiti sono stabili se conservati come prescritto (paragrafo 10), ma non oltre la data riportata sull'etichetta di ciascun flacone.

9 CONTENUTO DEL KIT

- | | | | | | | |
|------|---|---------|------------------|---------|---|--|
| 1. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>A</td><td>Ab</td></tr></table> | REAG | A | Ab | 1 flacone, Anticorpo anti angiotensina II da coniglio, liofilizzato, per 100 determinazioni.
Colore: giallo. | |
| REAG | A | Ab | | | | |
| 2. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>B</td><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> | REAG | B | Ag | ¹²⁵ I | 1 flacone, Angiotensina II marcata con ¹²⁵ I, con attività totale di 56 kBq, liofilizzata Attività specifica: 62-77 MBq/nmol (1700-2100 µCi/nmol).
Colore : blu. |
| REAG | B | Ag | ¹²⁵ I | | | |
| 3. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>C</td><td>DASP</td></tr></table> | REAG | C | DASP | 1 flacone, IgG anti coniglio da capra, legate a fase solida.
Sospensione di 11 mL. | |
| REAG | C | DASP | | | | |
| 4. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>D</td><td>ASSAY</td><td>BUF</td></tr></table> | REAG | D | ASSAY | BUF | 2 flaconi, Tampone fosfato 0,05 M, pH 7,4 con HSA 0,25 %, EDTA-Na ₂ 0,25 %, NaN ₃ 0,05 %, Trasylol 500 KIU/mL 2 x 50 mL (liquido) |
| REAG | D | ASSAY | BUF | | | |
| 5. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>E</td><td>CAL</td></tr></table> | REAG | E | CAL | 1 flacone, calibratore di angiotensina II, 300 pmol/L, 5,0 mL. Liofilizzato in tampone. | |
| REAG | E | CAL | | | | |
| 6. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>F</td><td>Control</td></tr></table> | REAG | F | Control | 1 flacone, Controllo di angiotensina II, livello basso, 2,0 mL. | |
| REAG | F | Control | | | | |
| 7. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>G</td><td>Control</td></tr></table> | REAG | G | Control | 1 flacone, Controllo di angiotensina II, livello elevato, 2,0 mL. | |
| REAG | G | Control | | | | |

10 PREPARAZIONE DEI REATTIVI

(ricostituire i reattivi 15 minuti prima dell'uso)

Reattivo	Ricostituzione		Stabilità	Note
Anti angiotensina II (Reattivo A)	22 mL di acqua distillata	Agitare delicatamente	A -20°C, tre mesi dopo ricostituzione	
Angiotensina II - ¹²⁵ I (Reattivo B)	22 mL di acqua distillata	Agitare delicatamente	A -20°C, fino alla data di scadenza	
Secondo anticorpo-fase solida (Reattivo C)	Pronto per l'uso. Il reattivo deve essere agitato con agitatore magnetico per 10 min a temperatura ambiente		A 2-8°C, fino alla data di scadenza	E' possibile pipettare il reattivo con una pipetta a ripetizione automatica
Tampone (Reattivo D)	Pronto per l'uso.		A 2-8°C, fino alla data di scadenza	
Calibratore di angiotensina II, 300 pmol/L (Reattivo E)	5,0 mL di acqua distillata	Agitare delicatamente	A -20°C, tre mesi dopo ricostituzione	Fare riferimento alla tabella per la preparazione della curva calibratore
Controllo di angiotensina II, livello basso (Reattivo F)	2,0 mL di acqua distillata	Agitare delicatamente	A -20°C, tre mesi dopo ricostituzione	La concentrazione del controllo è riportata sull'etichetta del flacone e sul foglio del controllo di qualità. Il controllo non deve essere estratto
Controllo di angiotensina II, livello elevato (Reattivo G)	2,0 mL di acqua distillata	Agitare delicatamente	A -20°C, tre mesi dopo ricostituzione	La concentrazione del controllo è riportata sull'etichetta del flacone e sul foglio del controllo di qualità. Il controllo non deve essere estratto

11 METODO DEL DOSAGGIO

A. Procedura di estrazione dal plasma

- Numerare una provetta di estrazione per ogni campione. Numerare due provette (R) per la determinazione del recupero dell'estrazione.
 - Mettere in ghiaccio le provette e l'etanolo.
 - Pipettare 1,0 mL di ciascun campione nelle rispettive provette di estrazione. NON ESTRARRE CALIBRATORE E CONTROLLI.
 - Preparare due provette per la determinazione del recupero (R):
 - Pipettare 1 mL di un plasma qualsiasi nelle provette per il recupero (R). Il campione deve avere
 - la stessa matrice proteica dei campioni da dosare.
 - Pipettare 200 µL Angiotensina II - ¹²⁵I nelle provette per il recupero (R).
 - Estrarre insieme ai campioni come descritto al punto 6.
 - Preparare due provette per il calcolo del recupero rispetto all'attività totale (TR).
 - Pipettare 200 µL Angiotensina II - ¹²⁵I nelle provette (TR).
 - Aggiungere 200 µL di tampone e agitare su vortex.
 - Tappare con cura le provette e conservarle per il conteggio.
 - Aggiungere 4 mL di etanolo freddo nelle provette con i campioni e in quelle per il recupero (R).
 - Agitare su vortex tutte le provette per 2 minuti.
 - Centrifugare tutte le provette a 2000 g 15 minuti a 2-8°C.
 - Decantare i surnatanti in provette numerate da 16 x 100 mm.
 - Evaporare i surnatanti in corrente d'azoto (temp. max 37°C).
 - Riprendere i campioni evaporati con 1 mL di tampone. Agitare vigorosamente su vortex.
 - E' possibile dosare subito i campioni o congelarli a -20°C e procedere al dosaggio in un giorno successivo.
- Se conservati a -20°C i campioni estratti e ricostituiti in tampone sono stabili 2 settimane.
- Riprendere l'evaporato delle provette per il recupero con 1 mL di tampone.
 - Trasferire 400 µL di soluzione da queste provette in due nuove provette (R) da 12 x 75 mm.
 - Contare le provette (TR), attività totale e (R), recupero per 2 minuti con un contatore gamma.

Calcolo del recupero:

Calcolare il recupero %, dividendo la media delle cpm delle provette per il recupero (R) per la media delle cpm delle provette per l'attività totale e moltiplicare per 1,0/0,4:

$$\text{Recupero\%} = \frac{\text{cpm delle provette per il recupero} \times 1,0}{\text{cpm delle provette per l'attività totale} \times 0,4} \times 100$$

B. Preparazione della curva calibratore

TABELLA PER LA DILUIZIONE DELLO CALIBRATORE		
Diluizione	Reattivo E	Concentrazione: 300 pmol/L
1 mL di reattivo E + 1 mL di tampone Agitare su vortex	Calibratore a	150 pmol/L
1 mL di calibratore a + 1 mL di tampone Agitare su vortex	Calibratore b	75 pmol/L
1 mL di calibratore b + 1 mL di tampone Agitare su vortex	Calibratore c	37,5 pmol/L
1 mL di calibratore c + 1 mL di tampone Agitare su vortex	Calibratore d	18,8 pmol/L
1 mL di calibratore d + 1 mL di tampone Agitare su vortex	Calibratore e	9,4 pmol/L
1 mL di calibratore e + 1 mL di tampone Agitare su vortex	Calibratore f	4,7 pmol/L

C. Metodo del dosaggio

- Mantenere in ghiaccio provette e reattivi durante tutte le fasi di pipettamento.
- Pipettare 400 µL di calibratore, controlli ed estratti dei campioni nelle rispettive provette di polistirene numerate in precedenza.
- Pipettare 400 µL di tampone (Reattivo D) nelle provette dello calibratore 0 pmol/L. (Massimo Legame - B_{max}).
- Pipettare 600 µL di tampone nelle provette per gli NSB.
- Aggiungere 200 µL di anticorpo anti angiotensina II (Reattivo A) in tutte le provette eccetto quelle per gli NSB e quelle per l'attività totale.
- Agitare su vortex e incubare 6 ore a 4°C.
- Aggiungere 200 µL Angiotensina II - ¹²⁵I (Reattivo B) in tutte le provette.
- Agitare su vortex e incubare 18-22 ore a 4°C.
- Pipettare 100 µL di sospensione di secondo anticorpo-fase solida in tutte le provette eccetto quelle per l'attività totale.
- Agitare su vortex e incubare 30 - 60 minuti a 4°C.
- Centrifugare tutte le provette, eccetto quelle per l'attività totale, 15 minuti a 1700 g a 4°C o a temperatura ambiente.
- Decantare con cura i surnatanti.
- Contare tutte le provette con un contatore gamma per 1-2 minuti.

	Tampone (D)	Calibratore, campioni, controlli	Anticorpo anti angiotensina II (A)		Angiotensina II - ¹²⁵ I (B)		Secondo anticorpo (C)		
Attività totale (TC)	-	-	-	Agitare su	200 µL	Agitare su	-	Agitare su	Agitare su
NSB	600 µL	-	-	vortex e	200 µL	vortex e	100 µL	vortex e	vortex e
St. 0 pmol/L	400 µL	-	200 µL	incubare	200 µL	incubare	100 µL	incubare	centrifugare
St. 4,7 pmol/L	-	400 µL	200 µL	6 ore a	200 µL	18-22 ore a	100 µL	30-60	15 minuti a
St. 9,4 pmol/L	-	400 µL	200 µL	4°C	200 µL	4°C	100 µL	minuti	1700 g a
St. 18,8 pmol/L	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL	a 4°C.	4° C.
St. 37,5 pmol/L	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL		Aspirare o
St. 75 pmol/L	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL		decantare il
St. 150 pmol/L	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL		surnatante.
Controlli	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL		Contare la
Campioni	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL		radioattività
									del precipitato
									per 1-2 minuti.

D. CALCOLO DEI RISULTATI

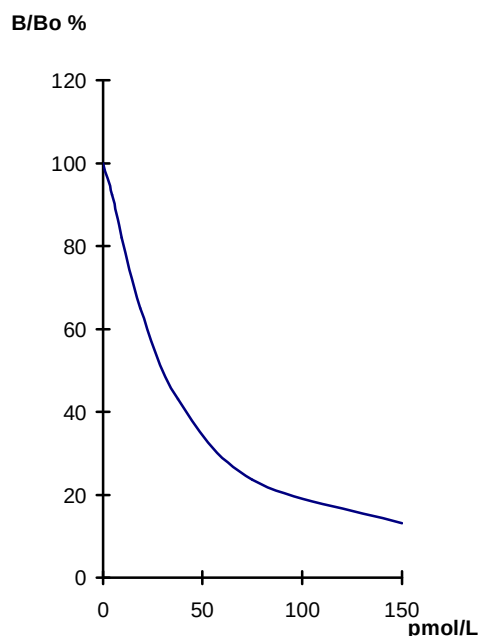
- Sottrarre la media delle cpm degli NSB degli calibratore dalle cpm dei replicati degli calibratore; sottrarre la media delle cpm degli NSB dei campioni dalle cpm dei replicati dei controlli e dei campioni.
- Generare la curva calibratore riportando in ordinata le cpm della frazione legata B o il rapporto di competizione B/T% e in ascissa le concentrazioni degli calibratore.
- Le concentrazioni di Gastrina in campioni e controlli vengono calcolate per interpolazione delle rispettive cpm della frazione legata B o del rapporto di competizione B/T% sulla curva calibratore.
- Se si usa un sistema di elaborazione computerizzato, usare il metodo di interpolazione Spline.
- Correggere il valore ottenuto per recupero.

E. Esempio di curva calibratore

	Media delle cpm	cpm corrette	B/Bo %	Risultati (pmol/L)
Attività totale	18582			
NSB	678			
Calibratore 0 pmol/L	9559	8881	100	
Calibratore f 4.7 pmol/L	8880	8202	92.4	
Calibratore e 9.4 pmol/L	7957	7279	82.0	
Calibratore d 18.8 pmol/L	7039	5781	65.1	
Calibratore c 37.5 pmol/L	4508	3830	43.1	
Calibratore b 75 pmol/L	2770	2099	23.6	
Calibratore a 150 pmol/L	1846	1168	13.1	
Controllo basso	7359	6681	75.2	13.1
Controllo alto	3145	2467	27.8	63.1

F. Esempio di curva calibratore

ANGIOTENSIN II CURVA CALIBRATORE



12 CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

12.1 Sensibilità

La sensibilità, calcolata come dose calcolata dalla curva calibratore della media – 2 DS delle cpm dello calibratore zero è risultata essere 5 pmol/L.

12.2 Precisione										
Intra saggio					Inter saggio					
	n	media pmol/L	SD	CV %		n	media pmol/L	SD	CV %	
Camp. A	20	13.3	0.44	3.3	Camp. A	6	11.6	0.55	4.8	
Camp. B	20	64.9	1.97	3.0	Camp. B	6	60.9	2.4	3.9	

12.3 Recupero		
A quattro diversi campioni sono state aggiunte differenti quantità di calibratore di angiotensina II		
Conc. attesa (pmol/L)	Conc. osservata (pmol/L)	Recupero%
12.4	12.3	99.2
23.9	23.5	96.8
27.2	22.0	103.0
46.0	51.1	111.0

12.4 Specificità

Sono state trovate le seguenti cross reazioni:

<u>Sostanza</u>	<u>Cross reazione %</u>
Angiotensin II	100
Angiotensin I	<0.1
Leu-Heptapeptide	100
Asn ¹ -Val ⁵ Angiotensin II	30
Sar ¹ Ile ⁸ Angiotensin II	100
Angiotensin III	80

13 VALORI NORMALI

Ogni laboratorio deve stabilire i propri limiti di normalità. Campioni di plasma da 11 soggetti apparentemente sani prelevati al mattino (ore 9-10) hanno dato i seguenti valori di Angiotensina II:

Limiti osservati: 19 - 38 pmol/L

14 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. S. Oparil, E. Haber, N. Engl. J. Med. 291, 389-401, 446-457 (1974).
2. W.F. Ganong.
Review of Medical Physiology, 6th ed., 342-344 (1973).
Lange Medical Publications, Los Althos, CA.
3. J. Voigt, B. Wittmann-Liebold, H. Köster.
Eur. J. Biochem, 122, 183-191 (1982).
4. O. Ganten, J.L. Minnich, P. Granger, K.Hayduk, H.M. Brecht, A. Barbeau, R. Boucher, J. Genest, Science 173, 64-65 (1971).
5. A. Leaf, G.W. Liddle, in
"Textbook of Endocrinology" p. 938 ed. R.H. Williams,
W.B. Saunders Co., Philadelphia (1974).
6. A. Saye.
Hypertension, 216-221 (1983).
7. V.J. Dzau.
Circulation 77 (Suppl 1.1) (1988).
8. Ch. Klett.
Clin. Exp. Hypert. 9, 2027-2047 (1987).
9. J.F.E. Mann.
Clin. Exp. Hypert. 10, 151-168 (1988).
10. J.J. Morton.
D.J. Webb, Clinical Science 68, 482-484 (1985).

Data di revisione: 2009-06-08



ANGIOTENSIN II- RIA

es

KIPERB320

USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

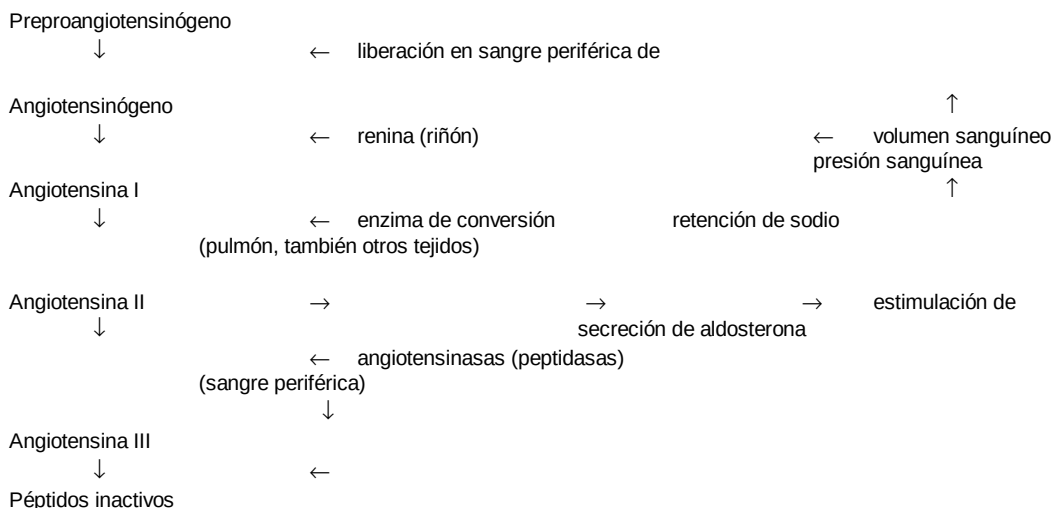
1 APLICACIÓN

El kit de angiotensina de DIAsource contiene reactivos e instrucciones para la medición cuantitativa de la angiotensina II en plasma. Después de la extracción, las concentraciones de angiotensina II se miden mediante un radioinmunoensayo (RIA).
Sólo para uso profesional en el laboratorio.

2 APLICACIÓN CLÍNICA

La angiotensina II es el producto biológicamente activo del sistema renina-angiotensina (1,2).

El octapéptido angiotensina II (peso molecular de 1046) es el vasoconstrictor fisiológico más potente de todos los conocidos. A partir de un precursor proteico de gran tamaño (preproangiotensinógeno) sintetizado en el hígado, se libera en una serie de procesos proteolíticos catalizados por enzimas procedentes de diversos tejidos (1, 2, 4). La angiotensina II tiene una vida muy corta en el plasma: una vez generada a partir de la angiotensina I, es degradada en péptidos fisiológicamente inactivos por varias peptidasas plasmáticas, con una media vida en plasma de menos de un minuto (5). El siguiente esquema resume el denominado sistema renina-angiotensina:



Puesto que la generación de angiotensina II a partir del angiotensinógeno a través de la angiotensina I está fuertemente influida por los cambios acontecidos en la actividad de la renina, se deben considerar atentamente todos los factores externos que influyen sobre la actividad de la renina: la actividad de la renina es elevada durante el embarazo, después del agotamiento de sodio, en posición erguida, y bajo el influjo de diversos fármacos, p.e. los anticonceptivos orales, la adrenalina, los vasodilatadores antihipertensivos, los diuréticos, y dosis elevadas de espironolactona y progesterona. Los factores que reducen la actividad de la renina son: la posición horizontal, el incremento del consumo de sodio, la α -metil-DOPA, la L-DOPA, el propranolol, la reserpina, la clonidina y la edad avanzada. La actividad de la renina también presenta un ritmo diurno, alcanzando los valores máximos por la mañana.

El radioinmunoensayo de la angiotensina II tiene una aplicación establecida en el tratamiento y monitorización de la hipertensión.

3 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Después de la extracción de las muestras de plasma, se analiza la angiotensina II mediante un radioinmunoensayo competitivo. En este radioinmunoensayo, se utiliza un antisuero de anti-angiotensina de conejo y un trazador de angiotensina II radioiodado. Las fases fijadas y libres se separan mediante un doble anticuerpo fijado a partículas en fase sólida, y después se centrifugan. Seguidamente se mide la radiactividad de las fracciones fijadas y se puede generar una curva de calibración típica.

4 PRECAUCIONES

1. Todos los materiales derivados de la sangre humana y utilizados en la preparación de este kit han sido analizados para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), los anticuerpos del HCV y para los anticuerpos del HIV-1 y HIV-2, obteniéndose resultados negativos. De todos modos, se deben manipular todos los componentes como si fueran una posible fuente de infección.
2. Los reactivos en este kit contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías formando depósitos de azidas altamente explosivos. A la hora de verter los residuos en las cañerías, utilizar un gran volumen de agua para evitar que se forme este tipo de azidas. Las tuberías de metal que se sospecha que puedan estar contaminadas con estos depósitos explosivos deben limpiarse a fondo con una solución de 10% de hidróxido de sodio.

- Los materiales radiactivos contenidos en este kit sólo pueden ser recibidos, adquiridos, poseídos y utilizados por médicos, laboratorios clínicos u hospitales y solamente se pueden usar en pruebas clínicas o de laboratorio *in vitro* sin que los materiales, ni la radiación derivada de ellos, puedan ser administrados interna o externamente a seres humanos o animales. Su recepción, posesión, uso y transferencia están sujetos a las regulaciones de cada país.

Este kit contiene I^{125} (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

El respeto de las reglas básicas de seguridad sobre radiactividad proporcionará una protección adecuada.

- Debe estar prohibido comer, beber, fumar o utilizar cosméticos donde se está utilizando material radiactivo.
- No pipetear soluciones radiactivas con la boca.
- Evitar el contacto directo con todos los materiales radiactivos mediante la utilización de artículos tales como batas de laboratorio y guantes no reutilizables.
- Todo el trabajo radiológico debe hacerse en un área designada a tal efecto.
- Los materiales radiactivos deben almacenarse en sus envases originales en un área designada a tal efecto.
- El equipo del laboratorio y todo el material de vidrio expuestos a contaminación, deben segregarse para evitar la contaminación cruzada de diferentes radioisótopos.
- En caso de derrame, el material radiactivo debe recogerse inmediatamente de acuerdo con los procedimientos establecidos al respecto.
- Todos los materiales radiactivos se deben eliminar de acuerdo con las regulaciones y pautas de las autoridades competentes.

5 RECOGIDA DE LA MUESTRA

Se recomienda estandarizar con cuidado la preparación del paciente y las condiciones de muestreo. Debido a la extrema inestabilidad de la angiotensina II en el fluido biológico, se debe tener mucho cuidado para asegurarse de que la muestra de sangre se recoge correctamente:

- Extraer sangre del paciente que esté en ayunas y se encuentre en posición recostada e introducirla en un tubo que contenga EDTA;
- Centrifugar inmediatamente a 4° C para separar el plasma.
- Congelar la muestra inmediatamente en tubos de plástico a -20° C hasta que se analice.

6 MATERIALES Y EQUIPO NECESARIOS

Pipetas (100 µL, 200 µL, 400 µL, 1 ml, 2 ml, 5 ml)
 Dosificadores de repetición (100 µL, 200 µL)
 Probeta de 25 ml
 Tubos de poliestireno, tubos de polipropileno o vidrio
 Agitador
 Centrífuga refrigerada
 Etanol p.A. 98%
 Concentrador al vacío o N₂ (nitrógeno)
 Baño de hielo
 Contador de radiaciones gamma

7 CONTROL DE CALIDAD

Los controles deben efectuarse para cada ensayo. Se incluyen dos controles en el kit, el valor (sin procedimiento de extracción) se indica en la hoja de Control y en las etiquetas de los viales. Utilizar los controles como se recomienda el fabricante del control de plasma y de acuerdo con la práctica empleada en los laboratorios de referencia para monitorizar la precisión y exactitud de los reactivos y las técnicas.

8 CADUCIDAD Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

Los reactivos de este kit son estables hasta la fecha de caducidad si se almacenan correctamente.

Todos los reactivos deben almacenarse a 2-8° C a partir de recepción del kit.

Los reactivos reconstituidos deben almacenarse de acuerdo con la tabla de la párrafo 10.

Los reactivos reconstituidos son estables de acuerdo con la tabla de la párrafo 10, sin exceder su fecha de caducidad.

9 CONTENIDO DEL KIT

- | | | |
|------|---|----|
| REAG | A | Ab |
|------|---|----|

1 vial, Anti-angiotensina II liofilizada (Conejo) para 100 tubos.
 Color: Amarillo.
- | | | | |
|------|---|----|-----------|
| REAG | B | Aq | I^{125} |
|------|---|----|-----------|

1 vial, 56 KBq o 1,5 µCi. Liofilizada. Actividad específica: 62-77 MBq/nmol (1700-2100 µCi/nmol).
 Color: Azul.
- | | | |
|------|---|------|
| REAG | C | DASP |
|------|---|------|

1 vial, Anticuerpos (IgG) de cabra anticonejo unidos a fase sólida.
 11 mL Suspensión.
- | | | | |
|------|---|-------|-----|
| REAG | D | ASSAY | BUF |
|------|---|-------|-----|

2 vials, Tampón fosfato de 0,05 M con 0,25 % HSA, 0,25 % de sal disódica EDTA, 0,05 % NaN₃, 500 KIU de Trasyol/mL., pH 7,4., 2 x 50 ml (líquido)
- | | | |
|------|---|-----|
| REAG | E | CAL |
|------|---|-----|

1 vial, 5 ml de estándar angiotensina II de 300 pmol/L. Liofilizado en tampón de ensayo.
- | | | |
|------|---|---------|
| REAG | F | Control |
|------|---|---------|

1 vial, 2 ml de control de angiotensina II liofilizado, nivel bajo.

7.	REAG	G	Control
----	------	---	---------

1 vial, 2 ml de control de angiotensina II liofilizado, nivel alto.

10 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

(reconstituir 15 minutos antes de utilizarlos)

Reactivo	Reconstituir cada vial con		Estable a	Observaciones
Anti-angiotensina II (Reactivo A)	22 ml agua destilada	Mezclar con suavidad	-20° C por lo menos 3 meses después de la reconstitución	
Angiotensina II I- ¹²⁵ (Reactivo B)	25 ml agua destilada	Mezclar con suavidad	-20° C hasta la fecha de caducidad	
Doble anticuerpo en fase sólida (Reactivo C)	Listo para su uso. El reactivo de separación debe colocarse en un agitador magnético durante 10 minutos a temperatura ambiente.		2-8° C hasta la fecha de caducidad	Es posible pipetear el reactivo con un dosificador de repetición
Tampón de ensayo (Reactivo D)	Listo para su uso		2-8° C hasta la fecha de caducidad	
Calibrador angiotensina II de 300 pmol/L (Reactivo E)	5 ml agua destilada	Mezclar con suavidad	-20° C por lo menos 3 meses después de la reconstitución	Consultar la tabla para la preparación de la curva de calibración
Angiotensina II Control bajo (Reactivo F)	2 ml agua destilada	Mezclar con suavidad	-20° C por lo menos 3 meses después de la reconstitución	El valor de control figura en la etiqueta del vial y en la hoja del control de calidad (sin extracción)
Angiotensina II Control alto (Reactivo G)	2 ml agua destilada	Mezclar con suavidad	-20° C por lo menos 3 meses después de la reconstitución	El valor de control figura en la etiqueta del vial y en la hoja del control de calidad (sin extracción)

11 REALIZACIÓN

A. Procedimiento de extracción del plasma

- Etiquetar un tubo de extracción para cada muestra del paciente. Etiquetar un tubo adicional (R) para estimar la recuperación de la extracción.
- Colocar los tubos de extracción y el etanol en hielo.
- Pipetear 1 ml de cada muestra en los tubos de extracción (E) adecuadamente etiquetados.
NO EXTRAER LOS CALIBRADORES NI LOS CONTROLES
- Preparar un tubo de estimación de la recuperación (R).
 - Pipetear 1 ml de la muestra de plasma aleatoria en el tubo de recuperación (R). La muestra utilizada en este ensayo de recuperación debe tener una matriz proteica similar a las muestras que se están analizando.
 - Añadir 200µL de trazador de angiotensina II I-¹²⁵ en dos tubos R.
 - Extraer esta muestra junto con las muestras del paso 6.
- Preparar un tubo de Recuperación Total (TR).
 - Añadir 200µL de trazador de angiotensina II I-¹²⁵ en dos tubos TR.
 - Añadir 200µL de tampón de ensayo y mezclar.
 - Tapar y separar este tubo a fin de efectuar la cuenta del cálculo de la recuperación
- Añadir 4 ml de etanol enfriado a cada muestra y al tubo de Recuperación (R).
- Mezclar y agitar durante 2 minutos.
- Centrifugar todos los tubos de extracción a 200 g. durante 15 minutos a 2-8° C.
- Decantar el sobrenadante de cada tubo de extracción en tubos de 16 x 100 mm previamente preparados, limpios y adecuadamente etiquetados.
- Evaporar los sobrenadantes con un chorro de nitrógeno hasta que se sequen (a 37° C como máximo).
- Reconstituir las muestras desecadas añadiendo 1 ml de tampón de ensayo y mezclar bien.
- Aplicar el procedimiento RIA inmediatamente o conservar las muestras extraídas a -20° C durante un máximo de dos semanas.
- Reconstituir la muestra de recuperación desecada (R) añadiendo 1 ml de tampón de ensayo y mezclar bien.
- Pipetear 400µL del tubo de la muestra de recuperación reconstituida (R) en dos tubos de ensayo de 12 x 75 mm.
- Efectuar la cuenta en los tubos de recuperación total (TR) y de recuperación (R) durante por lo menos dos minutos con un contador gamma.

Control de recuperación:

Calcular el % de recuperación dividiendo las CPM de los tubos de recuperación (R) por las CPM de los tubos de recuperación total (TR) y multiplicando el resultado por 1,0/0,4:

% de recuperación: $\frac{\text{tubo de recuperación CPM}}{\text{tubo de recuperación total CPM}} \times 100$ $\frac{1,0}{0,4} \times 100$

B. Preparación de soluciones estándar

TABLA PARA LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES CALIBRADOR		
Dilución	Reactivo E	Concentración 300pmol/L
Mezclar 1000µL de Reactivo E y 1000µL de tampón de ensayo	calibrador a	150 pmol/L
Mezclar 1000µL de calibrador a y 1000µL de tampón de ensayo	calibrador b	75 pmol/L
Mezclar 1000µL de calibrador b y 1000µL de tampón de ensayo	calibrador c	37,5 pmol/L
Mezclar 1000µL de calibrador c y 1000µL de tampón de ensayo	calibrador d	18,8 pmol/L
Mezclar 1000µL de calibrador d y 1000µL de tampón de ensayo	calibrador e	9,4 pmol/L
Mezclar 1000µL de calibrador e y 1000µL de tampón de ensayo	calibrador f	4,7 pmol/L

C. Procedimiento del ensayo

- Mantener los tubos de ensayo y los reactivos en un baño de hielo durante todo el proceso.
- Pipetear 400µL de cada calibrador, 400µL de los controles y 400µL de cada extracto de plasma por duplicado en los tubos de polietileno etiquetados correspondientes.
- Añadir 400µL de tampón de ensayo (Reactivo D) a los tubos de fijación máxima (fijación de 0 pmol/L).
- Añadir 600µL de tampón de ensayo a los tubos NSB.
- Añadir 200µL de antisuero de angiotensina II (Reactivo A) a cada tubo, exceptuando los tubos NSB y TC.
- Mezclar e incubar durante 6 horas a 4° C.
- Añadir 200µL de trazador de angiotensina II I-¹²⁵ (Reactivo B) a todos los tubos.
- Mezclar todos los tubos e incubar a 4° C durante 18-22 horas.
- Mientras se agitan continuamente, añadir 100µL de doble anticuerpo en fase sólida (Reactivo C) a todos los tubos, exceptuando los tubos TC.
- Mezclar e incubar durante 30-60 minutos a 4° C.
- Centrifugar todos los tubos durante 15 minutos a 1700 g a 4° C o a temperatura ambiente.
- Decantar los sobrenadantes con cuidado.
- Contar los residuos durante 1-2 minutos.

	Tampón de Ensayo (D)	Calibrador o muestra o control	Antisuero de anti-angiotensina II (A)	Angiotensina II I- ¹²⁵ (B)	Reactivo de separación (C)	
Cuentas totales (TC)	-	-	-	200µL	-	Agitar y
NSB	600µL	-	-	200µL	100µL	centrifugar
Est. 0 pmol/L	400µL	-	200µL	200µL	100µL	durante 15
Est. 4,7 pmol/L	-	400µL	200µL	200µL	100µL	minutos a
Est. 9,4 pmol/L	-	400µL	200µL	200µL	100µL	1700 g a
Est. 18,8 pmol/L	-	400µL	200µL	200µL	100µL	+4° C.
Est. 37,5 pmol/L	-	400µL	200µL	200µL	100µL	Aspirar o decantar
Est. 75 pmol/L	-	400µL	200µL	200µL	100µL	los
Est. 150 pmol/L	-	400µL	200µL	200µL	100µL	sobrenadantes.
controles	-	400µL	200µL	200µL	100µL	Contar los
Muestra desconocida	-	400µL	200µL	200µL	100µL	residuos durante
						1-2 minutos.

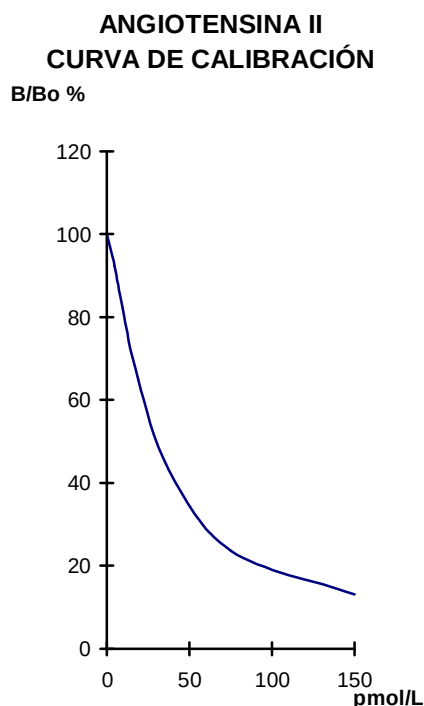
D. Cálculo de los resultados del ensayo

1. Restar la media de CPM de los tubos NSB de la media de CPM de las réplicas de los calibradores, controles y muestras del paciente.
2. Representando gráficamente la CPM, el % B/Bo o el % B/T de la fracción fijada en función de las concentraciones de los calibradores de angiotensina II se genera una curva de calibración.
3. Para obtener la concentración de angiotensina II en las muestras extraídas del paciente y los controles, se interpolan de la curva de calibración generada las CPM, % B/Bo o % B/T de las fracciones fijadas de los precipitados derivados.
4. La curva de calibración también se puede realizar utilizando procedimientos informáticos. Para reducir los datos mediante métodos automatizados, se pueden utilizar tanto los métodos logit/log como Spline.
5. Corregir los valores de plasma en función del % de recuperación de extracción.

E. Datos de la Curva de calibración

	Media CPM	CPM Corregida	% B/Bo	Resultados (pmol/L)
Cuentas totales	18582			
NSB	678			
Calibrador 0 pmol/L	9559	8881	100	
Calibrador f 4,7 pmol/L	8880	8202	92,4	
Calibrador e 9,4 pmol/L	7957	7279	82,0	
Calibrador d 18,8 pmol/L	7039	5781	65,1	
Calibrador c 37,5 pmol/L	4508	3830	43,1	
Calibrador b 75 pmol/L	2770	2099	23,6	
Calibrador a 150 pmol/L	1846	1168	13,1	
Control bajo	7359	6681	75,2	13,1
Control alto	3145	2467	27,8	63,1

F. Ejemplo de Curva de calibración



12. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

12.1 Sensibilidad

La sensibilidad es de 2 pmol/L, medida a partir de 3 desviaciones estándares por debajo del calibrador cero.

12.2 Precisión									
Intra-ensayo					Inter-ensayo				
	n	media (pmol/L)	Desviación Estándar	% c.v.		n	media (pmol/L)	Desviación Estándar	% c.v.
muestra A	20	13,3	0,44	3,3	muestra A	6	11,6	0,55	4,8
muestra B	20	64,9	1,97	3,0	muestra B	6	60,9	2,4	3,9

12. 3 Recuperación			
Se añadieron cantidades conocidas de calibrador de angiotensina II en cuatro muestras:			
Muestra	Concentración esperada (pmol/L)	Concentración obtenida (pmol/L)	% de recuperación
A1	12,4	12,3	99,2
A2	23,9	23,5	96,8
A3	27,2	22,0	103,0
A4	46,0	51,1	111,0

12.4 Especificidad

El antisuero de vasopresina se obtiene del conejo. Las siguientes reactividades cruzadas se midieron al 50% B/Bo.

<u>Péptido</u>	<u>Reacción cruzada</u>
Angiotensina II	100
Angiotensina I	<0,1
Heptapéptido Leu	100
Angiotensina II Asn ¹ - Val ⁵	30
Angiotensina Sar ¹ Ile ⁸	100
Angiotensina III	80

13 LORES NORMALES

Cada laboratorio debe establecer su propio rango de valores normales. Las muestras de sangre se extrajeron de 11 adultos aparentemente normales (9,00 - 10,00 horas) y se determinaron los niveles de angiotensina II.

Rango encontrado: 19 - 38 pmol/L

14 REFERENCIAS

1. S. Oparil, E. Haber, N. Engl. J. Med. 291, 389-401, 446-457 (1974).
2. W.F. Ganong.
Review of Medical Physiology, 6th ed., 342-344 (1973).
Lange Medical Publications, Los Althos, CA.
3. J. Voigt, B. Wittmann-Liebold, H. Köster.
Eur. J. Biochem, 122, 183-191 (1982).
4. O. Ganten, J.L. Minnich, P. Granger, K.Hayduk, H.M. Brecht, A. Barbeau, R. Boucher, J. Genest, Science 173, 64-65 (1971).
5. A. Leaf, G.W. Liddle, en
"Textbook of Endocrinology" p. 938 ed. R.H. Williams,
W.B. Saunders Co., Philadelphia (1974).
6. A. Saye.
Hypertension, 216-221 (1983).
7. V.J. Dzan.
Circulation 77 (Supl 1.1) (1988).
8. Ch. Klett.
Clin. Exp. Hypert. 9, 2027-2047 (1987).
9. J.F.E. Mann.
Clin. Exp. Hypert. 10, 151-168 (1988).
10. J.J. Morton.
D.J. Webb, Clinical Science 68, 482-484 (1985).

Fecha de la revisión: 2009-06-08



ANGIOTENSIN II- RIA

SV**KIPERB320****IN VITRO DIAGNOSTISK ANVÄNDNING**

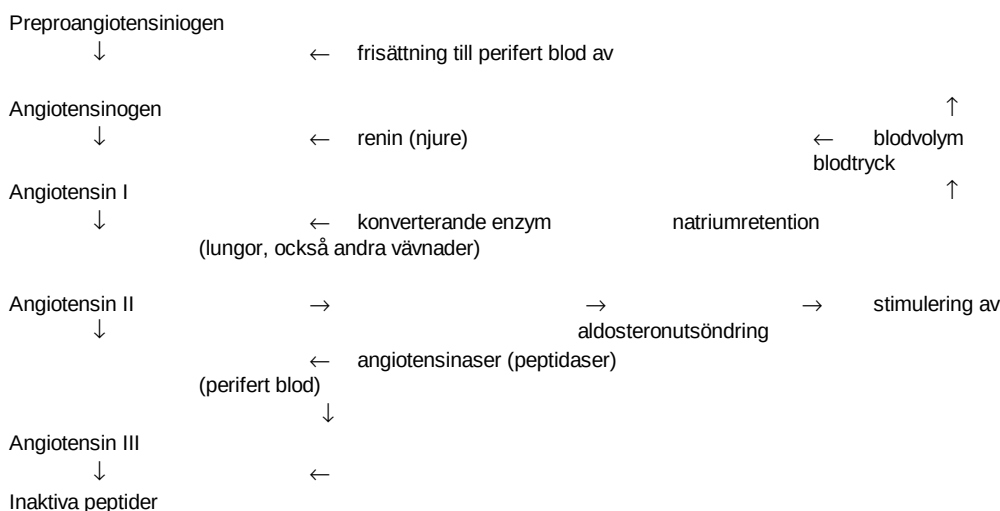
DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 ANVÄNDNINGSSOMRÅDE

DIAsource kit för angiotensin II innehåller reagens och anvisningar för kvantitativ bestämning av angiotensin II i plasma. Efter extraktion bestäms halterna av angiotensin II genom radioimmunoanalys (RIA). Reagenssatsen är avsedd för yrkesmässigt bruk vid ett analyslaboratorium.

2 KLINISK APPLIKATION

Angiotensin II är den biologiskt aktiva produkten från renin-angiotensinsystemet (1, 2). Oktapeptiden angiotensin II (molekylvikt 1046) är den starkaste kända fysiologiska vasokonstriktorn. Det frigörs från en stor proteinprekursor (pre-pro-angiotensinogen) syntetiserad i levern genom en serie av proteolytiska steg katalyserade av enzymer från varierande vävnader (1, 2, 4). Angiotensin II är mycket kortlivad i plasma: Efter generering från angiotensin I, degraderas det vidare till fysiologiskt inaktiva peptider av olika plasma-peptidaser med en halveringstid i plasma av mindre än en minut (5). Det så kallade renin-angiotensinsystemet visas schematiskt nedan:



Eftersom genereringen av angiotensin II från angiotensinogen via angiotensin I är starkt påverkad av förändringar i reninaktiviteten, måste alla externa faktorer som påverkar reninaktiviteten noggrant övervägas: Reninaktiviteten är förhöjd under graviditet, efter natriumreducering, i upprätt ställning och påverkas av ett flertal läkemedel t ex orala kontraceptiva, adrenalin, antihypertensiva vasodilatorer, diuretika, höga doser av spironolakton och progesteron. Faktorer som minskar reninaktiviteten är: Horisontellt läge, ökat natriumupptag, α -metyl-DOPA, L-DOPA, propanol, reserpin, clonidin och hög ålder. Reninaktiviteten är också föremål för en dygnsrytm med toppvärden på morgonen.

Angiotensin-II-radioimmunoanalysen har sin etablerade applikation i behandling och uppföljning av högt blodtryck.

3 PRINCIP

Efter extraktion av plasmaprov analyseras angiotensin II genom kompetitiv radioimmuno-analys. Vid radioimmunoanalysen används ett kaninantiserum mot angiotensin II och angiotensin II som märkts med radioaktivt jod. Den bundna och den fria fraktionen separeras med hjälp av en andra antikropp som är bunden vid en partikulär fast fas. Radioaktiviteten i den bundna fraktionen mäts, och en typisk kalibreringskurva kan genereras.

4 VARNING

Endast för in vitro diagnostik

Eftersom föreskrifter varierar från land till land, är det av vikt att den person som är ansvarig för laboratoriet känner till gällande föreskrifter avseende radioaktivt material av den typ och mängd som används i denna analys.

Kitet innehåller komponenter med humant ursprung. Dessa har testats för hepatit B antigen samt antikroppar mot HCV, HIV-1 och HIV-2 och befunnits negativa. Komponenterna ska trots detta hanteras som möjlig smittrisk.

Vidta åtgärder enligt lokala och/eller landets föreskrifter avseende handhavande av radioaktivt material. Endast bemyndigad personal ska ha tillgång till reagenserna.

Detta kit innehåller ^{125}I (halveringstid: 60 dagar), avger röntgen (X: 28 keV) och gamma (γ : 35.5 keV) strålar.

Följande säkerhetsåtgärder ska iakttas vid handhavande av radioaktivt material:

- Radioaktivt material ska förvaras i härför avsedda utrymmen, normalt ej tillgängliga för ej bemyndigad personal.
- Hantering av radioaktivt material ska ske i för ändamålet avsedda utrymmen.
- Försiktighet ska iakttas för att förhindra intag och kontakt med huden och kläderna. Pipettera inte radioaktivt material med munnen.
- Att äta, dricka eller röka ska vara förbjudet i utrymmen där radioaktivt material hanteras.
- Handskar ska användas och händerna ska tvättas efter hantering av radioaktivt material.
- Hantering ska ske på yta täckt med absorberande material.
- Utspillt radioaktivt material ska torkas upp omedelbart och allt kontaminerat material ska kasseras som radioaktivt avfall. Kontaminerade ytor ska torkas av med rengöringsmedel.

Reagensen i kitet innehåller natriumazid. Kontakt med avloppsrör av koppar eller bly kan resultera i ackumulerad bildning av mycket explosiva azidavlagringar.

Vid utspolning av reagens i avloppet ska rikliga mängder vatten spolas med för att undvika uppkomst av metallisk azid. Rör som misstänks vara kontaminerade av explosiva avlagringar ska spolas/sköljas noggrant med 10% natriumhydroxidlösning.

5 PROVTAGNING

Noggran standardisering rekommenderas för förberedelser av patient och provtagning. Eftersom angiotensin II i biologiska vätskor är mycket känsligt måste blodprovet tas med stor omsorg

- blodprovet tas med fastande patient i ryggläge och blodet uppsamlas i ett kallt rör med EDTA
- provet centrifugeras omedelbart vid 4° C för att separera plasman
- plasman fryses omedelbart i plaströr vid -20° C fram till analystillfället.

6 MATERIAL OCH UTRUSTNING SOM BEHÖVS

Pipetter (100 µL, 200 µL, 400 µL, 1.00 ml, 2.00 ml, 5.00 ml)

Repeterande pipetter (100 µL, 200 µL)

Mätglas 25 ml

Polystyrenprovorr, polypropenprovorr eller glasprovorr

Vortexblandare

Kyld centrifug

Etanol p.a. 98%

Vakuumindestare eller kvävgas

Isbad

Gammarräknare

7 KVALITETSKONTROLL

Vid varje analysomgång ska kontroller analyseras. Två kontroller ingår i kitet, och analysvärdet (utan extraktionsprocedur) anges på Kontrollbladet och på ampullerna. Använd kontroller enligt tillverkarens rekommendationer och enligt god laboratoriesed för att kontrollera noggrannhet och precision hos reagens och metoder.

8 HÅLLBARHET OCH FÖRVARING

Detta kit är stabilt fram till utgångsdatum vid förvaring enligt anvisningarna.

När kitet tagits emot ska alla reagens lagras vid 2-8° C.

När reagens rekonstituerats ska de lagras enligt anvisningarna i tabellen under punkt 10.

De rekonstituerade reagensen har den stabilitet som anges under punkt 10, dock aldrig längre än till angivet utgångsdatum.

9 KITETS INNEHÅLL

- | | | |
|------|---|----|
| REAG | A | Ab |
|------|---|----|

1 ampull, Frystorkat anti-angiotensin II (från kanin) till 100 rör.
Färg: Gult.
- | | | | |
|------|---|----|------------------|
| REAG | B | Ag | ¹²⁵ I |
|------|---|----|------------------|

1 ampull, 56 KBq eller 1.5 µCi. Frystorkat Specifik aktivitet: 62-77 MBq/nmol (1700-2100 µCi/nmol).
Färg: Blått.
- | | | |
|------|---|------|
| REAG | C | DASP |
|------|---|------|

1 ampull, Anti-kanin-IgG från get, bundet vid fast fas.
11 ml suspension.
- | | | | |
|------|---|-------|-----|
| REAG | D | ASSAY | BUF |
|------|---|-------|-----|

2 ampuller, 0.05 M fosfatbuffert med 0.25% HSA, 0.25% EDTA dinatriumsalt, 0.05% NaN₃, 500 KIU Trasyol/ml, pH 7.4., 2 x 50 ml (vätska)
- | | | |
|------|---|-----|
| REAG | E | CAL |
|------|---|-----|

1 ampull, 5.0 ml angiotensin II kalibrator, 300 pmol/L. frystorkat i analysbuffert.

6.	REAG	F	Control
----	------	---	---------

1 ampull, 2.0 ml frystorkat angiotensin II-kontroll, låg nivå.

7.	REAG	G	Control
----	------	---	---------

1 ampull, 2.0 ml frystorkat angiotensin II-kontroll, hög nivå.

10 BEREDNING AV REAGENS

(rekonstituera 15 minuter före användning)

Komponent	Rekonstituera ampullen med		Stabil vid	Särskild anmärkning
Anti-angiotensin II (reagens A)	22 ml destillerat vatten	Blanda försiktigt	-20° C under minst 3 månader efter rekonstituering	
¹²⁵ I-märkt angiotensin II (reagens B)	25 ml destillerat vatten	Blanda försiktigt	-20° C fram till utgångsdatum	
Dubbel antikropp i fast fas (reagens C)	Klart för användning. Separations-reagenset bör omröras i 10 minuter med magnetomrörare vid rumstemperatur		2-8° C fram till utgångsdatum	Pipettera gärna med repeterande pipett
Analysbuffert (reagens D)	Klart för användning.		2-8° C fram till utgångsdatum	
Angiotensin II-kalibrator 300 pmol/L (reagens E)	5.00 ml destillerat vatten	Blanda försiktigt	-20° C under minst 3 månader efter rekonstituering	Se tabellen gällande kalibreringskurva
Angiotensin II, låg kontroll (reagens F)	2.00 ml destillerat vatten	Blanda försiktigt	-20° C under minst 3 månader efter rekonstituering	Kontrollprovets koncentration anges på ampullen och på QC-bladet (utan extraktion)
Angiotensin II, hög kontroll (reagens G)	2.00 ml destillerat vatten	Blanda försiktigt	-20°C under minst 3 månader efter rekonstituering	Kontrollprovets koncentration anges på ampullen och på QC-bladet (utan extraktion)

11 GENOMFÖRANDE

A. Extraktion av plasma

- Märk ett extraktionsrör för varje patientprov. Märk ett extra rör (R) för att bestämma extraktionsutbytet.
- Placera extraktionsrören samt etanol på is.
- Pipettera 1.0 ml av varje prov i de märkta extraktionsrören.
KALIBRATOREN OCH KONTROLLER SKA INTE EXTRAHERAS.
- Gör i ordning ett rör (R-rör) för bestämning av extraktionsutbytet.
 - Pipettera 1.0 ml av ett slumpmässigt valt plasmaprov i R-röret. Det prov som används för utbytesbestämningen bör ha samma proteinmatris som de prov som analyseras.
 - Tillsätt 200 µL ¹²⁵I-märkt angiotensin II till två R-rör.
 - Extrahera detta prov samtidigt med proven enligt steget 6.
- Gör i ordning ett rör för bestämning av total radioaktivitet (TR-rör):
 - Pipettera 200 µL ¹²⁵I-märkt angiotensin II i två TR-rör.
 - Tillsätt 200 µL analysbuffert och blanda.
 - Sätt lock på dessa rör och sätt åt sidan för senare mätning av total radioaktivitet.
- Tillsätt 4 ml kyld etanol till varje rör med prov och R-rör.
- Vortexblanda under 2 minuter.
- Centrifugera alla extraktionsrör vid 2000 x g under 15 minuter vid 2-8° C.
- Dekantera supernatanten från varje extraktionsrör, till rengjorda och märkta provrör 16x100 mm.
- Indunsta supernatanten under kvävgas till torrhet (vid högst 37° C).
- Rekonstituera de torkade proven genom att tillsätta 1.0 ml analysbuffert och blanda noggrant med vortexblandare.
- Genomför RIA-proceduren omedelbart, eller förvara de extraherade proven vid -20° C under upp till två veckor före analys.
- Rekonstituera de torkade utbytesproven (R-rören) genom att tillsätta 1.0 ml analysbuffert och blanda noggrant med vortexblandare.
- Pipettera 400 µL av det rekonstituerade utbytesprovet (R-röret) i två provrör 12x75 mm.
- Räkna sönderfallen i TR-rören och R-rören under minst två minuter i gammaraäkaren.

Beräkning av utbyte:

Beräkna procent utbyte genom att dividera CPM-värdet för R-rören med CPM-värdet för TR-rören och multiplicera med 1.0/0.4:

$$\% \text{ utbyte} = (\text{CPM i R-rör} / \text{CPM i TR-rör}) \times (1.0 / 0.4) \times 100$$

B. Beredning av kalibrator prov

TABELL GÄLLANDE BEREDNING AV STANDARDER		
Spädning	Reagens E	Koncentration 300 pmol/L
1000 µL av reagens E + 1000 µL analysbuffert vortexblandning	kalibrator a	150 pmol/L
1000 µL av kalibrator a + 1000 µL analysbuffert vortexblandning	kalibrator b	75 pmol/L
1000 µL av kalibrator b + 1000 µL analysbuffert vortexblandning	kalibrator c	37.5 pmol/L
1000 µL av kalibrator c + 1000 µL analysbuffert vortexblandning	kalibrator d	18.8 pmol/L
1000 µL av kalibrator d + 1000 µL analysbuffert vortexblandning	kalibrator e	9.4 pmol/L
1000 µL av kalibrator e + 1000 µL analysbuffert vortexblandning	kalibrator f	4.7 pmol/L

C. Analysprocedur

- Förvara analysrören och reagensen i isbad vid alla pipetteringssteg.
- Pipettera 400 µL av respektive kalibrator, 400 µL av kontroll samt 400 µL av plasmaextrakten i duplikat, i märkta polystyrenprovrör.
- Tillsätt 400 µL av analysbuffert (reagens D) till maxbindningsrören (0 pmol/L).
- Tillsätt 600 µL av analysbuffert till OSB-rören (blankprov).
- Tillsätt 200 µL av antiserum mot angiotensin II (reagens A) till varje rör, förutom blankprov och TC-rör.
- Vortexblanda och inkubera under 6 timmar vid 4° C.
- Pipettera 200 µL av ¹²⁵I-angiotensin II (reagens B) i samtliga rör.
- Vortexblanda samtliga rör och inkubera vid 4° C under 18-22 timmar.
- Under kontinuerlig omrörning av reagenset tillsätts 100 µL dubbel antikropp på fast fas (reagens C) till alla rör utom TC-rören.
- Vortexblanda och inkubera under 30-60 minuter vid 4° C.
- Centrifugera samtliga rör under 15 minuter vid 1700 x g och 4° C, eller vid rumstemperatur.
- Dekantera supernatanterna försiktigt
- Räkna sönderfall i centrifugellet under 1-2 minuter.

	Analys- buffert (D)	kalibrator, analys- prov, kontroll	Anti-angiotensin antiserum (A)		¹²⁵ I-märkt angiotensin II (B)		Separationsreagens (C)	
Total aktivitet (TC)	-	-	-	Vortex-	200 µL	Vortex-	-	Vortex-
Blank (OSB)	600 µL	-	-	blanda och	200 µL	blanda och	100 µL	blanda och
St. 0 pmol/L	400 µL	-	200 µL	inkubera	200 µL	inkubera	100 µL	inkubera
St. 4,7 pmol/L	-	400 µL	200 µL	under 6	200 µL	under	100 µL	under 15
St. 9,4 pmol/L	-	400 µL	200 µL	timmar vid	200 µL	18-22	100 µL	30 - 60
St. 18,8 pmol/L	-	400 µL	200 µL	4° C.	200 µL	timmar vid	100 µL	minuter vid
St. 37,5 pmol/L	-	400 µL	200 µL		200 µL	4° C.	100 µL	4° C.
St. 75 pmol/L	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL	vid 4° C. Sug
St. 150 pmol/L	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL	upp eller håll
kontroller	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL	av superna-
Okänt prov	-	400 µL	200 µL		200 µL		100 µL	tanten. Räkna
		400 µL	200 µL		200 µL		100 µL	sönderfall i
								återstoden
								under 1 - 2
								minuter.

D. Beräkning av analysresultat

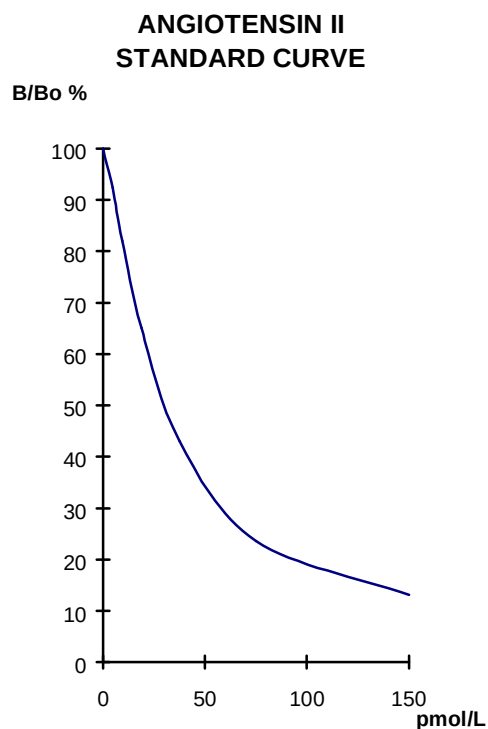
- Subtrahera medelvärdet för räknade sönderfall (CPM) i OSB-rören från medelvärdet för CPM i kalibratoren, kontroller och patientprover.
- Rita en kalibreringskurva genom att avsätta CPM, %B/B₀ eller %B/T för precipiterad bunden fraktion mot koncentrationen i angiotensin II-kalibrator.
- För att beräkna halten av angiotensin II i extraherade patientprov och kontroller interpoleras CPM, %B/B₀ eller %B/T för proverna med hjälp av kalibreringskurvan.
- Kalibreringskurvan kan också genereras med datorstöd. För datastödd kurvritning kan både logit/log- och splinemetoden användas.
- Korrigerade plasmavärdena utgående från erhållet utbyte i procent.

E. Kalibreringskurv data

	Medel	Korrigerad	%	Resultat
--	-------	------------	---	----------

	cpm	cpm	B/Bo	(pmol/L)
Total counts	18582			
OSB	678			
kalibrator 0 pmol/L	9559	8881	100	
kalibrator f 4.7 pmol/L	8880	8202	92.4	
kalibrator e 9.4 pmol/L	7957	7279	82.0	
kalibrator d 18.8 pmol/L	7039	5781	65.1	
kalibrator c 37.5 pmol/L	4508	3830	43.1	
kalibrator b 75 pmol/L	2770	2099	23.6	
kalibrator a 150 pmol/L	1846	1168	13.1	
Kontroll, låg	7359	6681	75.2	13.1
Kontroll, hög	3145	2467	27.8	63.1

F. Exempel på kalibreringskurva



12 PRESTANDA

12.1 Känslighet

Känsligheten är 2.0 pmol/L, vilket motsvarar en ändring med 3 gånger standardavvikelsen för bunden aktivitet i 0-standard.

12.2 Precision									
Vid samma analysomgång					Mellan olika analysomgångar				
	n	Medel- värde pmol/L	SD	% V.K.		n	Medel- värde pmol/L	SD	% V.K.
prov A	20	13.3	0.44	3.3	prov A	6	11.6	0.55	4.8
prov B	20	64.9	1.97	3.0	prov B	6	60.9	2.4	3.9

12.3 Utbyte

Fyra olika prov försattes med olika mängder angiotensin II- kalibrator:

Prov	Förväntad konc. (pmol/L)	Avläst konc. (pmol/L)	% utbyte
A1	12.4	12.3	99.2
A2	23.9	23.5	96.8
A3	27.2	22.0	103.0
A4	46.0	51.1	111.0

12.4 Specificitet

Antiserum mot angiotensin II erhålls från kanin. Följande korsreaktivitet uppmättes vid 50% B/B₀.

<u>Peptid</u>	<u>Korsreaktion</u>
---------------	---------------------

Angiotensin II	100
Angiotensin I	<0.1
Leu-heptapeptide	100
Asn ¹ -Val ⁵ angiotensin II	30
Sar ¹ Ile ⁸ angiotensin II	100
Angiotensin III	80

13 NORMALOMRÅDE

Varje laboratorium bör bestämma sitt eget normalområde för förväntade värden. Blodprov togs från 11 till synes friska vuxna (mellan kl 09.00 och 10.00) och angiotensin II-nivåerna bestämdes.

Uppmätta värden: 19-38 pmol/L

14 REFERENSER

1. S. Oparil, E. Haber, N. Engl. J. Med. 291, 389-401, 446-457 (1974).
2. W.F. Ganong. Review of Medical Physiology, 6th ed., 342-344 (1973). Lange Medical Publications, Los Althos, CA.
3. J. Voigt, B. Wittmann-Liebold, H. Köster. Eur. J. Biochem, 122, 183-191 (1982).
4. O. Ganten, J.L. Minnich, P. Granger, K.Hayduk, H.M. Brecht, A. Barbeau, R. Boucher, J. Genest, Science 173, 64-65 (1971).
5. A. Leaf, G.W. Liddle, in "Textbook of Endocrinology" p. 938 ed. R.H. Williams, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1974).
6. A. Saye. Hypertension, 216-221 (1983).
7. V.J. Dzan. Circulation 77 (Suppl 1.1) (1988).
8. Ch. Klett. Clin. Exp. Hypert. 9, 2027-2047 (1987).
9. J.F.E. Mann. Clin. Exp. Hypert. 10, 151-168 (1988).
10. J.J. Morton. D.J. Webb, Clinical Science 68, 482-484 (1985).

Utfärdat: 2009-06-08

	<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 Extracção	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
	Σωληνάκια	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	Polyetylglykol
	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	Lejáratí 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 (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB koncentrátum
	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	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		
	Партиден код		
	Каталожен номер		
	Контрол		
	Ин витро диагностично медицинско изделие		
	Производител		
	Съдържание достатъчно за <n> теста		
	Концентриран измиващ разтвор		
	Нулев калибратор		
	Калибратор #		
	Контрол #		
	Трейсър		
	Трейсър		
	Концентриран маркер		
	Концентриран маркер		
	Епруветки		
	Инкубационен буфер		
	Ацетонитрил		
	Серум		
	Разредител за пробите		
	Буфер за разреждане		
	Антисерум		
	Имуноабсорбент		
	Разредител за калибратора		
	Пресъздаващ разтвор		
	Полиетилен гликол		
	Екстрактов разтвор		
	Разтвор за елюиране		
	Силикагелни пълнители		
	Пред-лечебен разтвор		
	Неутрализиращ разтвор		
	Маркерен буфер		
	Микротитърна пластина		
	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза		
	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза		
	HRP конюгиран концентрат		
	HRP конюгиран концентрат		
	Буфер за конюгата		
	Хромогенен TMB концентрат		
	Хромогенен TMB разтвор		
	Субстратен буфер		
	Стоп разтвор		
	Инкубационен серум		
	Буфер		
	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза		
	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат		
	Биотин конюгиран концентрат		
	Авидин HRP концентрат		
	Буфер за пробите		
	Биотин конюгат		
	специфично анти тяло		
	стрептавидин HRP концентрат		
	не специфично свързване		
	второ анти тяло		
	киселинизиращ буфер		