

ZenTech



RIAZEN Renin Plasma Activity

Deutsch (de)

English (en)

Español (es)

Français (fr)

Italiano (it)

Polski (pl)

БЪЛГАРСКИ (bg)

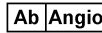
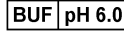
ZenTech s.a.

Liège Science Park,
Avenue du Pré-Aily 10,
4031 ANGLEUR, Belgium
Tel. : + 32-(0)4-361.42.32
Fax : + 32-(0)4-367.00.63

info@zentech.be

www.zentech.be

ISO15223	SYMBOLE FÜR MEDIZINPRODUKTE	MEDICAL DEVICES SYMBOL	SÍMBOLOS PARA APARATOS DE USO EN MEDICINA	SYMBOLES APPLIQUES AUX DISPOSITIFS MEDICAUX	SIMBOLI DISPOSITIVI MEDICI	SYMBOL URZĄDZENIA MEDYCZNEGO	СИМВОЛИ НА МЕДИЦИНСКАТА АПАРАТУРА
	LIMITIERUNG DER LAGERTEMPORATUR	STORAGE TEMPERATURE LIMITATION	LÍMITES DE TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO	LÍMITES DE TEMPERATURES	LIMITAZIONI DI TEMPERATURA	OGRANICZENIA TEMPERATURY PRZECHOWYWANIA	ОГРАНИЧАВАНЕ ТЕМПЕРАТУРАТА НА СЪХРАНЕНИЕ
	CHARGENCODE	BATCH CODE	CÓDIGO DE LOTE	NUMÉRO DE LOT	NUMERO DI LOTTO	KOD SERII	ПАРТИДЕН НОМЕР
	VERWENDBAR BIS	USE BY	CONSUMIR ANTES DE	DATE D'EXPIRATION	DATA DI SCADENZA	ZUŻYĆ PRZED	СРОК НА ГОДНОСТ
	DAS HANDBUCH ZU RATE ZIEHEN	CONSULT OPERATING INSTRUCTIONS	CONSULTAR LAS INSTRUCCIONES DE MANEJO O FUNCIONAMIENTO	LIRE LES INSTRUCTIONS	CONSULTI L'ISTRUZIONE PER L'USO	ZAPOZNAĆ SIĘ Z INSTRUKCJĄ	ВИЖТЕ ИНСТРУКЦИИТЕ ЗА ЕКСПЛОАТАЦИЯ
	FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTISCHE ANWENDUNG	IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICE	DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO	IN VITRO DIAGNOSTIC	DISPOSITIVO MEDICO-DIAGNOSTICO IN VITRO	URZĄDZENIE DO DIAGNOSTYKI IN VITRO	УРЕД ЗА IN VITRO ДИАГНОСТИКА
	HERGESTELLT VON	MANUFACTURED BY	FABRICADO POR	FABRIQUE PAR	PRODOTTO DA	PRODUCENT	ПРОИЗВЕДЕНО ОТ
	KATALOG NR.	CATALOGUE NUMBER	NÚMERO DE CATÁLOGO	REFERENCE	NUMERO DI CATALOGO	NUMER KATALOGOWY	КАТАЛОЖЕН НОМЕР

	SYMBOLE (EMPFOHLEN VON DER EDMA)	SYMBOLS (EDMA RECOMMENDATIONS)	SÍMBOLOS (RECOMENDACIONES DE LA EDMA)	SYMBOLES (recommandations EDMA)	SIMBOLI (raccomandazioni EDMA)	SYMBOLE (wg zaleceń EDMA)	СИМВОЛИ (ПРЕПОРЪКИ НА EDMA)
	Anzahl der Bestimmungen (Σ)	Number of determinations (Σ)	Número de determinaciones (Σ)	Nombre de déterminations (Σ)	Numero di determinazioni (Σ)	Liczba oznaczeń (Σ)	БРОЙ ИЗМЕРВАНИЯ
	Kalibratoren	Calibrators	Calibradores	Calibrateur	Calibratore	Kalibratory	КАЛИБРАТОРИ
	Renin Antikörper	Renin Antiserum	Antisero Renin	Renin Antisérum	Renin Antisiero	Antysurowica reninowa	Ренин антисерум
	Renin ¹²⁵ J-markierter	Renin Tracer	Isótopo Radioactivo Renin	Traceur Renin	Renin Tracciante	Znacznik reninowy	Ренин трейсър
	Renin Puffer pH6.0	Renin Generation Buffer pH6.0	Tampón de generación a pH6.0 Renin	Renin Tampon de generation pH6.0	Renin Tampone di Generazione pH6.0	Bufor generacyjny reninowy pH 6,0	Ренин буфер за синтез pH6.0
	Renin Trennreagenz	Renin Separation Reagent	Reactivo de Separación Renin	Renin Réactif de séparation	Renin Reattivo di Separazione	Odczynnik separacyjny reninowy	Ренин сепарационен реагент
	Renin Enzyminhibitor	Renin Enzyme Inhibitor	Inhibidor enzimático Renin	Renin Inhibiteur enzymatique	Renin Inibitore Enzimatico	Inhibitor enzymatyczny reninowy	Ренин ензимен инхибитор

	RADIOAKTIVES MATERIAL	RADIOACTIVE MATERIAL	MATERIAL RADIOACTIVO	MATERIEL RADIOACTIF	MATERIALE RADIOATTIVO	MATERIAŁ RADIOAKTYWNY	РАДИОАКТИВЕН МАТЕРИАЛ
---	-----------------------	----------------------	----------------------	---------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

DEUTSCH

NUR FÜR DIE IN - VITRO – DIAGNOSTIK BESTIMMT

R-EX-125 125 Bestimmungen

1. VERWENDUNG

Der Testsatz RENIN dient der quantitativen Bestimmung der Plasmareninaktivität (PRA) in humanem Plasma. Die Methode umfasst ohne Verdünnung einen Messbereich von 0,033 bis 25 ng/ml.

2. PHYSIOLOGIE

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist ein hormonelles "Kaskade"-System, dessen erste Komponente das Angiotensinogen ist. Renin, ein proteolytisches Enzym, transformiert Angiotensinogen in Angiotensin I, ein Polypeptid, das nicht biologisch aktiv ist. Angiotensin I ist das Substrat, das durch ein "converting enzyme" in das biologisch aktive Angiotensin II umgewandelt wird. Die wichtigsten biologischen Aktivitäten von Angiotensin II sind die Vasokonstriktion und die Regulation der Synthese und Freisetzung von Aldosteron, das die Elektrolyt-Bilanz moduliert. Daher ist das System über verschiedene Mechanismen bei der Regulation des Blutdrucks involviert. Es ist möglich, durch die Messung der Plasmareninaktivität die Aktivität des Systems zu bewerten; sowohl Angiotensin I als auch Renin-Assays haben methodische Probleme (niedrige Werte beim ersten, strukturell ähnliche Enzyme beim zweiten). Renin wird in den juxta-glomerulären Zellen der Niere gebildet und hat ein Molekulargewicht von ca. 40.000 Dalton. Die Messung der PRA ist ein gutes Mittel, um die Prognose und Therapie von Patienten mit Hypertonie zu beurteilen. Trotzdem ist es notwendig, verschiedene Faktoren zu kennen, die die Werte verändern können, wie z.B. Natriumaufnahme, aufrechte oder liegende Haltung oder Medikamentengabe. Die Plasmareninaktivität steigt bei reduzierter Natriumaufnahme an und sinkt im Liegen. Außerdem führen einige Medikamente wie Diuretika oder orale Kontrazeptiva zu einem Anstieg, L-Dopa oder Reserpin zu einer Verringerung der Plasmareninaktivität.

Hyperreninismus kann aufgrund verschiedener Konstellationen auftreten:

- Hyperreninismus mit Hypertonie: reno-vaskulärer Bluthochdruck, Wilms-Tumor, Robertson-Kihara-Syndrom.
- Hyperreninismus ohne Hypertonie: Natriummangel, nephrotisches Syndrom, Bartter-Syndrom.

Hyporeninismus kann aufgrund verschiedener Konstellationen auftreten:

- Hyporeninismus mit Hypertonie: Conn-Syndrom, primärer Pseudohyperaldosteronismus, Biglieri-Syndrom und einige Fälle von essentieller Hypertonie.
- Hyporeninismus ohne Hypertonie: Hypoaldosteronismus, Natriumbelastung und positive Wasserbilanz, verminderte Aktivität des sympathischen Nervensystems.

In einigen Fällen kann es sinnvoll sein, Veränderungen der Plasmareninaktivität nach Stimulationstests zu überprüfen (z.B. nach Furosemidstimulation).

3. TESTPRINZIP

Die Konzentration bzw. Aktivität von Renin im Plasma wird nicht direkt, sondern durch die radioimmunologische Bestimmung von Angiotensin I ermittelt. Vor der radioimmunologischen Bestimmung wird das Plasma inkubiert, und unter standardisierten Bedingungen wird durch Renin Angiotensin I gebildet. Ein Enzyminhibitor verhindert den enzymatischen Abbau von Angiotensin I während des Entwicklungsschrittes. Für die Entwicklung des Angiotensin zwei können zwei verschiedene Ph-Bedingungen gewählt werden:

- Generation Buffer pH 7,4 (separat erhältlich)
Entspricht den physiologischen Bedingungen.
- Generation Buffer pH 6,0 (im Kit enthalten)

Die gebildete Angiotensin-I-Menge ist doppelt so hoch wie diejenige, die bei pH 7,4 gebildet wird; diese Methode ist somit besser für Proben mit niedriger Plasmareninaktivität geeignet.

Die Entwicklung von Angiotensin I verläuft zeitlich linear, man erhält also die gleichen Ergebnisse bei geänderter Entwicklungszeit. Dieser Test sieht trotzdem eine Inkubationszeit von 90 Minuten bei pH 6,0 und 3 Stunden bei pH 7,4 vor, um die Methode zu standardisieren und eine gute Präzision zu garantieren. Nach der Entwicklungszeit wird der

Radioimmunoassay durchgeführt. Unmarkiertes Antigen (Patientenserum bzw. Standards), radioaktiv markiertes Antigen und ein spezifisches Antiserum werden in definierten Mengen in einem Röhrchen gemischt und inkubiert. Die radioaktiv markierten und unmarkierten Antigene konkurrieren während der Inkubation um die begrenzte Anzahl der Bindungsstellen am 1. Antikörper. In dieser Reaktion bilden markiertes und unmarkiertes Antigen mit dem Antiserum Antigen-Antikörper-Komplexe. Die Komplexbildung strebt nach dem Massenwirkungsgesetz ein Gleichgewicht an. Nach der Inkubation wird die Trennung von freiem und gebundenem Angiotensin I mit einem 2. Antikörper durchgeführt. Der 2. Antikörper ist kovalent an magnetisierbare Partikel gebunden. Dies ermöglicht eine schnelle Trennung von gebundenem und freiem Antigen mit Hilfe einer einfachen Magnetplatte. Anschließend wird unter dem Einfluss des Magneten das freie Antigen mit dem Überstand dekantiert. Das im Röhrchen verbliebene Präzipitat wird in einem Gammacounter gemessen.

4. REAGENZIEN - Vorbereitung und Lagerung

Bei größeren Testansätzen dürfen nur Reagenzien mit der gleichen Chargennummer verwendet werden. Die Chargennummern auf den Röhrchen und Reagenzien sollten mit denen auf dem Kontrolltestzertifikat übereinstimmen. Verwenden Sie die Kitkomponenten nur bis zum angegebenen Verfallsdatum.

Der Renin Kit enthält ausreichend Reagenzien für 125 Bestimmungen und ist bis zum angegebenen Verfallsdatum bei 2-8°C haltbar.

1. **Renin ¹²⁵J-markierter, 1 Fläschchen:** Das Fläschchen enthält 13,0 ml ¹²⁵J-markiertes Angiotensin I in Phosphatpuffer mit BSA und 0,05% Natriumazid. Max. Radioaktivität: 85 kBq. Gebrauchsfertig; Lagerung bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum. NICHT EINFRIEREN.
2. **Renin Kalibratoren, 8 Fläschchen:** 8 Fläschchen mit Angiotensin I in Phosphatpuffer mit BSA und <0,2% Natriumazid in den Konzentrationen 0- 0,2- 0,5- 1,0- 2,0- 5,0- 10,0 und 25,0 ng/ml; lyophilisiert. Der Nullstandard wird mit 2,0 ml, die übrigen Standards werden mit 1,0 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Vorsichtig mischen, bis das Lyophilisat gründlich gelöst ist. Lagerung bis zu 24 Stunden bei 2-8°C oder bis zum Verfallsdatum bei -20°C.
3. **Renin Antikörper, 1 Fläschchen:** Das Fläschchen enthält Phosphatpuffer mit Anti-Angiotensin-I-Antikörper (Kaninchen), mit Kaninchen-Gammaglobulin, BSA und 0,05% Natriumazid; lyophilisiert. Mit 12,5 ml destilliertem Wasser rekonstituieren und gründlich mischen, bis das Lyophilisat vollständig gelöst ist. Lagerung nach Rekonstitution bis zu 3 Tage bei 2-8°C oder bis zum Verfallsdatum bei -20°C.
4. **Renin Trennreagenz, 1 Fläschchen:** Das Fläschchen enthält 125 ml Anti-Kaninchen-Gammaglobulin (Ziege), gebunden an magnetisierbare Partikel, in Tris-Puffer mit BSA und < 0,1 % Natriumazid. Gebrauchsfertig; Lagerung bei 2-8°C bis zum auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum. NICHT EINFRIEREN.
5. **Renin Enzyminhibitor, 1 Fläschchen:** Das Fläschchen enthält (0,5 ml) 5 % Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) in ethanolischer Lösung. Gebrauchsfertig; Lagerung bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum. Wenn die Lösung Kristallisation zeigt, das geschlossene Fläschchen auf 37°C erwärmen. Achtung: Das Fläschchen nicht offen stehenlassen.
6. **Renin Generation Puffer pH 6,0, 1 Fläschchen:** Das Fläschchen enthält 6,0 ml Phosphatpuffer mit gelbem Farbstoff und <0,1% Natriumazid. Gebrauchsfertig; Lagerung bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum. NICHT EINFRIEREN.
7. **Renin Generation Puffer pH 7,4, 1 Fläschchen:** (separat erhältlich) Das Fläschchen enthält 3,0 ml Phosphatpuffer mit orangem Farbstoff und <0,1% Natriumazid; gebrauchsfertig. Lagerung bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum. NICHT EINFRIEREN.

5. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Die Reagenzien sind nur zur In-vitro-Diagnostik bestimmt. Mit diesem Test sollte nur erfahrendes Laborpersonal arbeiten. Der Umgang sollte nach Maßgabe der „Guten Laborpraxis“ (GLP) erfolgen.

Bei größeren Testansätzen dürfen nur Reagenzien mit der gleichen Chargennummer verwendet werden.

Physikalisches Daten of ¹²⁵I: Ende die Arbeitsanleitung sehen

1. **Radioaktivität:** Der Kit soll bis zu seiner Verwendung unter Strahlenschutzbedingungen gelagert werden. Es wird auf die Vorschriften der Strahlenschutzverordnung hingewiesen. Folgende Regeln gelten neben anderen bei der Handhabung von radioaktivem Material:

- o Nicht rauchen, trinken oder essen.
- o Nie radioaktive Lösungen mit dem Mund pipettieren.
- o Hände möglichst mit Gummihandschuhen schützen.
- o Verschüttete radioaktive Lösungen sofort abwischen und kontaminierte Geräte dekontaminieren. Einwegmaterialien werden zum radioaktiven Abfall gegeben.
- o Ständige Arbeitsmittel sind wiederholt auf Kontamination hin zu prüfen.
- o Radioaktiver Abfall muß grundsätzlich an eine Sammelstelle abgegeben werden.

Eine Lagerung von kurzlebigen radioaktivem Abfall (z.B. J-125) bis zum praktisch vollständigen Abklingen und seine anschließende Beseitigung wie normaler Abfall ist möglich, bedarf aber der Genehmigung der Aufsichtsbehörde. Nach § 3 der Strahlenschutzverordnung dürfen wir radioaktive Reagenzien nur an Personen liefern, die im Besitz einer entsprechenden Umgangsgenehmigung sind.

Auf Wunsch nennen wir Ihnen das zuständige Gewerbeaufsichtsamt zur Beantragung einer Umgangsgenehmigung; gerne sind wir Ihnen dabei behilflich.

2. **Natriumazid:** Einige Reagenzien enthalten Natriumazid (<0,2%) als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei und Kupfer explosive Metallazide bilden. Reagenzienreste sollten daher mit reichlich Wasser verdünnt beseitigt werden. Nicht mit der Haut oder Schleimhaut in Berührung bringen.

Risiko-Sätze:

R-21/22 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.

Sicherheits-Sätze:

S-26 Bei Berührung mit Augen gründlich mit Wasser abwaschen und Arzt konsultieren.

S-28.1 Bei Berührung mit der Haut gründlich mit viel Wasser abwaschen.

S-46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.

3. **Humanserum:** Das für einige Reagenzien verwendete Humanserum wurde mit Immunoassays auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg) und Anti-HIV überprüft und negativ gefunden. Dennoch wird empfohlen, diese Reagenzien wie auch die Patienten-Proben als potentiell infektiös zu betrachten und entsprechend zu handhaben. Es ist wahrscheinlich, daß in dem Produkt Antikörper gegen das Hepatitis-C-Virus nachweisbar sind. Obwohl die Nachweisbarkeit von HCV-Antikörpern nicht zwingend bedeuten muß, daß die Materialien infektiös sind, sollten zur Vermeidung eines Ansteckungsrisikos geeignete Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung beachtet werden.

6. PROBENVORBEREITUNG UND VERDÜNNUNG

In diesen Assay müssen Plasmaproben eingesetzt werden. Entnehmen Sie die Proben bei Raumtemperatur. Die EDTA-Na₂-Röhrchen (2 mg/ml Blut) nicht kühlen oder auf Eis lagern. Zentrifugieren Sie die Röhrchen in einer ungekühlten Zentrifuge und trennen Sie das Plasma sofort nach der Zentrifugation von den Zellen. Nicht gekühlt lagern. Das Plasma nach max. 6 Stunden einfrieren. Wenn die Proben gekühlt oder für einen längeren Zeitraum Temperaturen von < 6 °C ausgesetzt werden oder in flüssigem Zustand (d.h. nicht gefroren) gekühlt werden, tritt eine Kryoaktivierung, d.h. eine Konversion von Prorenin zu Renin auf (12,13). Vor der Testdurchführung sollten die Proben in lauwarmem Wasser schnell aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht werden. Patienten unter Einnahme von Diuretika, Antihypertensiva, Vasodilatoren oder oralen

Kontrazeptiva sollten die Aufnahme für 2 Wochen vor der Testdurchführung unterbrechen. Dasselbe gilt für den Genuss von Lakritze. Die Renin-Konzentration ist während der Schwangerschaft und bei Diäten mit reduzierter Salzaufnahme erhöht. Außerdem, da Renin sowohl durch die Körperposition als auch durch eine diurnale Rhythmik beeinflusst wird, sollten die Proben am Morgen entnommen und die Position des Patienten (sitzend oder liegend) sollte dokumentiert werden. Nicht wiederholt auftauen und einfrieren. Eventuelle Verdünnungen können nach der Bildung von Angiotensin I mit dem kitinternen Nullstandard durchgeführt werden.

Achtung:

- Verwenden Sie kein Heparin als Antikoagulan, da es bei der Bildung von Angiotensin I zu Interferenzen führt.
- Verwenden Sie keine hämolysierten Proben. Stark ikterische Proben.

7. ARBEITSANLEITUNG

1. Packungsinhalt

Der Renin Kit (Code: R-EX-125) enthält folgende Komponenten:

Reagenz	Fläschchen
Renin ¹²⁵ J-markierter	1
Renin Kalibratoren	8
Renin Antikörper	1
Renin Trennreagenz	1
Renin Generation Puffer H 6.0	1
Renin Enzyminhibitor	1

2. Auf Anfrage erhältlich

Generation Buffer pH 7.4 (Code: R-EX-LC).

3. Zusätzlich benötigtes Material

- destilliertes Wasser.
- Präzisionspipetten mit Einmal-Spitzen 0,01 und 1,0 ml.
- Plastikröhrchen.
- Wasserbad 37 ± 2°C.
- Vortexmischer.
- -Separator und Rack.
- Saugfähiges Papier.
- Eisbad.
- Gamma-counter.

4. Entwicklung des Angiotensin I

Für die Entwicklung des Angiotensin I können zwei verschiedene pH-Bedingungen gewählt werden: Generation Buffer pH 7.4 (separat erhältlich) oder Generation Buffer pH 6.0 (im Kit enthalten). Die Verfahrensweise ist in beiden Fällen gleich. Pipettieren Sie in Plastikröhrchen in der angegebenen Reihenfolge:

1. 1,0 ml Probe.
2. 0,01 ml Enzyminhibitor (PMSF).
3. 0,1 ml Generation Puffer.
4. Mischen (Vortex-Mischer).
5. Bereiten Sie für jede Probe 4 Röhrchen vor, und stellen Sie in 2 Racks:
 - 2 Röhrchen für die Inkubation bei 37°C (Röhrchen mit "37" markieren);
 - 2 Röhrchen für die Inkubation im Eisbad bei 4°C (Röhrchen mit "4" markieren).
6. Pipettieren Sie aus dem oben beschriebenen Ansatz jeweils 0,1 ml in die vier Teströhrchen, und inkubieren Sie entsprechend bei 4°C im Eisbad bzw. 37 °C im Wasserbad. Die Inkubationszeiten betragen 3 Stunden bei Verwendung des Generation Puffer pH 7.4 oder 90 Minuten beim Generation Buffer pH 6.0. Danach werden die Probenröhrchen, die bei 37°C inkubiert wurden, im Eisbad auf 4°C gekühlt.

5. Radioimmunoassay

Vorbereitung des Testansatzes

Stellen Sie folgende Röhrchen zu den o.g. Probenröhrchen ins Eisbad:

- 2 Röhrchen für die Totalaktivität (TA).
- 2 Röhrchen für die NSB.
- 2 Röhrchen für B0.
- 2 Röhrchen für jede Standardkonzentration.

Testdurchführung

- 0,1 ml Nullstandard in die Röhrchen für B0 pipettieren.
- 0,2 ml Nullstandard in die Röhrchen für NSB pipettieren.
- 0,1 ml der übrigen Standards in die entsprechend markierten Röhrchen pipettieren.
- 0,1 ml Renin Tracer in alle Röhrchen pipettieren.
- 0,1 ml Renin Antiserum in alle Röhrchen außer TA und NSB pipettieren.
- Den Inhalt aller Röhrchen mischen (Vortex-Mischer) und 18-20 Stunden im Eisbad im Kühlschrank bei 4°C inkubieren.
- Das Eisbad aus dem Kühlschrank nehmen und - während die Röhrchen im Eisbad bleiben - 1,0 ml Renin Separation Reagent in alle Röhrchen außer TA pipettieren.
Hinweis: Während des Pipettierens das Fläschchen ab und zu schütteln, damit die Suspension homogen bleibt. **KEINEN MAGNETRÜHRER VERWENDEN!**
- Den Inhalt aller Röhrchen mischen (Vortex-Mischer). Das Rack aus dem Eisbad nehmen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Die Röhrchen für die TA aus dem Rack nehmen.
- Das Rack mit den Röhrchen in den Separator schieben und die magnetisierbaren Partikel 10 Minuten magnetisch trennen. Alle Röhrchen müssen mit der Oberfläche des Separators in Kontakt stehen.
- Den Überstand aus allen Röhrchen durch vorsichtiges Umdrehen des Separators dekantieren. Den umgedrehten Separator auf saugfähiges Papier stellen und mehrfach kräftig aufklopfen, um an den Röhrchen haftende Restflüssigkeit vollständig zu entfernen.
- Messen Sie die Aktivität in den Röhrchen eine Minute in einem Gammacounter.

8. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Von allen Doppelwerten (Standards und Patientenproben, nicht TA) wird der Mittelwert bestimmt und anschließend der Mittelwert der NSB subtrahiert. Die cpm-Mittelwerte von B0 werden verwendet, um die prozentuale Bindung in Abwesenheit von unmarkiertem Antigen (maximale Bindung) zu berechnen:

$$\frac{\text{cpm-Mittelwert B0}}{\text{cpm-Mittelwert der Totalaktivität}} \times 100 = \% \text{ Bindung}$$

Die relative prozentuale Bindung der Standards und Proben wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{cpm-Mittelwert (Standard/Probe)}}{\text{cpm-Mittelwert B0}} \times 100 = \% \text{ relative Bindung}$$

Die so errechneten relativen Bindungen werden auf semilogarithmischem Papier gegen die entsprechenden Angiotensin I-Standardkonzentrationen aufgetragen. Die Plasmareninaktivität (PRA) wird als ng/ml/Std. nach folgender Formel berechnet:

$$\text{PRA} = \frac{(\text{ng/ml "37"} - \text{ng/ml "4"}) \times 1,11^*}{\text{Std.**}} = \text{ng/ml/Std.}$$

* = Verdünnungsfaktor der Probe nach Zugabe von PMSF und Generation Buffer.

** = Inkubationszeit (in Stunden) für die Entwicklung von Angiotensin I.

1. Berechnungsbeispiel - Beispiel einer Standardkurve

Röhrchen	cpm Mittelwert	B/T (%)	B/BO (%)	Konzentration (ng/ml)
Totalaktivität	26114	-	-	-
NSB	274	1,05	-	-
B0	21217	81,25	-	-
St. 0,2 ng/ml	18458	-	86,8	-
St. 0,5 ng/ml	15002	-	70,3	-
St. 1,0 ng/ml	10906	-	50,8	-
St. 2,0 ng/ml	7060	-	32,4	-
St. 5,0 ng/ml	3551	-	15,6	-
St. 10,0 ng/ml	2077	-	8,6	-
St. 25,0 ng/ml	1064	-	3,8	-
Probe 1 (4°C)	17053	-	80,12	0,31
Probe 1 (37°C)	2103	-	8,73	9,84

$$(9,84 - 0,31) \times 1,11$$

$$\text{Probe 1} = \frac{\text{Ergebnis}}{1,5} = 7,05 \text{ ng/ml/Std.}$$

Hinweis: Diese Daten dienen als Beispiel und dürfen nicht anstelle der in jedem Testansatz zu ermittelnden Werte verwendet werden.

INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

9. ERWARTETE WERTE

Probe	Plasmareninaktivität in ng/ml/Std. pH 6,0	pH 7,4
Orthostase	0,98 - 4,18	0,15 - 2,12
im Liegen	0,51 - 2,64	0,12 - 1,59

Die Bereiche wurden bei Patienten mit einer Natriumausscheidung von ca. 100 mEq/24 Std. ermittelt. Nach Möglichkeit sollte jedes Laboratorium seine eigenen Normalwerte bestimmen.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

1. Richtigkeit - Wiederfindung

Pool-Plasmaproben wurden vor und nach der Zugabe verschiedener Mengen von Angiotensin I bestimmt, und die mittlere prozentuale Wiederfindung des zugefügten Angiotensin I wurde berechnet.

Probe	zugefügtes Angiotensin I (ng/ml)	gemessenes Angiotensin I (ng/ml)	Wiederfindung (%)
1	0,0	1,40	-
	10,0	10,29	88,9
	5,0	6,17	95,3
	2,0	3,45	102,3
	1,0	2,43	103,0
	0,5	1,94	107,0
2	0,0	1,97	-
	10,0	12,22	102,5
	5,0	6,42	89,0
	2,0	3,85	94,3
	1,0	2,97	100,7
	0,5	2,46	98,8
3	0,0	3,21	-
	10,0	13,90	106,9
	5,0	8,25	100,8
	2,0	5,37	108,0
	1,0	4,30	109,0
	0,5	3,67	92,0

2. Richtigkeit - Linearität von Verdünnungen

Drei Patientenproben wurden über mehrere Stufen mit RENIN Nullstandard verdünnt, und die prozentuale Wiederfindung wurde berechnet. Verdünnungen müssen nach der Entwicklung von Angiotensin I durchgeführt werden.

Verdünnungs-faktor	gemessene Angiotensin I-Konz. (ng/ml)	erwartete Angiotensin I-Konz. (ng/ml)	Wiederfindung (%)
-	14,51	-	-
2	7,38	7,26	101,7
4	3,92	3,63	108,1
8	1,83	1,81	101,1
16	0,83	0,91	91,7
32	0,39	0,45	85,6

ENGLISH

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

R-EX-125 125 Determinations

1. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the measurement of Plasmatic Renin Activity in human Plasma.

2. EXPLANATION OF THE TEST

Renin-angiotensin-aldosterone system is a hormonal "cascade" system, whose first compound is represented by angiotensinogen. Renin, a proteolytic enzyme, transforms angiotensinogen into angiotensin I a polipeptide which has not biological activity. Angiotensin I is the substrate on which converting enzyme acts, producing biologically active angiotensin II. The main biological actions of angiotensin II consist of vasoconstriction, regulation of synthesis and release of aldosterone which modulates electrolytes balance. Thus the system is involved in regulation of blood pressure with several mechanisms. It is possible to evaluate system activity by measurement of plasmatic renin activity, because either angiotensin I or renin assay have methodological problems (low values for the first one, presence of structurally similar enzymes for the second one). Renin is synthesized by iuxta-glomerular apparatus of kidney and it has a molecular weight about 40.000 Dalton. The measurement of its activity is a valid tool in order to determine prognosis and therapy for patients affected by blood hypertension. Nevertheless it is important to know several factors which may alter the values such as: sodium intake, upright or supine position and drugs. Plasmatic renin activity increases with the reduction of sodium intake and it decreases changing the upright position into supine position. Moreover some drugs such as diuretics or oral contraceptives can produce an increase while other ones such as L-Dopa, Reserpine can lower renin activity.

Hyperreninism can be due to several situations:

- Hyperreninism with blood hypertension: reno-vascular hypertension, Wilms' tumor, Robertson-Kihara syndrome.
- Hyperreninism without blood hypertension: sodium depletion, nephrotic syndromes, Bartter's syndrome.

Hyporeninism can be due to several situations:

- Hyporeninism with blood hypertension: Conn's syndrome, primary pseudo-hyperaldosteronism, Biglieri's syndrome, some cases of essential hypertension.
- Hyporeninism without blood hypertension: hypoaldosteronism, hydro-saline retention, reduced activity of sympathetic nervous system.

In some situations it can be useful to evaluate changes of plasmatic renin activity after dynamic tests. One of the more useful test is furosemide stimulation.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The kit has been designed for determination of plasmatic renin activity by radioimmunoassay of angiotensin I. Before radioimmunoassay, plasma must be incubated so that renin generates angiotensin I in standardized conditions. Enzymatic inhibitor avoids the enzymatic degradation of angiotensin I during generation step.

Procedure foresees that the user can choose pH generation.

The kit gives the possibility to performe the plasma generation at two different pH:

- Generation Buffer pH 6.0, utilizing the vial supplied with set reagents
- Generation Buffer pH 7.4, utilizing the vial provided only by request.

pH 7.4 generation is the same process involved in human physiology, blocking the activity of the other enzymes of the plasma.

pH 6.0 generation produces twice the amount as much pH 7.4, so that pH 6.0 method is more reliable for low renin activity samples.

Angiotensin generation is a linear function in the time, so the same results are reached changing generation time. Nevertheless the procedure foresees 90 minutes incubation at pH 6.0 and 3 hours incubation at pH 7.4 in order to standardize the method and to guarantee a good precision. After generation radioimmunoassay is performed. Antigen, whether from standards or from samples competes

Verdünnungs-faktor	gemessene Angiotensin I-Konz. (ng/ml)	erwartete Angiotensin I-Konz. (ng/ml)	Wiederfindung (%)
-	19,74	-	-
2	9,77	9,87	99,0
4	5,11	4,94	103,5
8	2,48	2,47	100,5
16	1,15	1,23	93,2
32	0,60	0,62	97,3
-	20,18	-	-
2	9,66	10,09	95,7
4	5,05	5,04	100,1
8	2,51	2,52	99,5
16	1,14	1,26	90,1
32	0,62	0,63	97,7

3. Präzision

Die Intraassay-Variation (VK) wurde durch 20fache Bestimmung von 3 verschiedenen Kontrollseren in einem Testansatz ermittelt.

Kontrolle	Mittelwert $\pm$ 1 s ng/ml	VK %
1	2,86 $\pm$ 0,15	5,10
2	4,66 $\pm$ 0,28	6,04
3	6,41 $\pm$ 0,22	3,39

Die Interassay-Variation (VK) wurde durch die Bestimmung von 3 Kontrollseren in 10 verschiedenen Testansätzen ermittelt.

Probe	Mittelwert $\pm$ 1 s ng/ml	VK %
1	2,96 $\pm$ 0,15	5,15
2	4,61 $\pm$ 0,19	4,18
3	6,33 $\pm$ 0,24	3,82

4. Sensitivität

Die Nachweisgrenze dieses Assays ist definiert als der kleinste von Null unterscheidbare Wert und wurde als Mittelwert aus der 20fachen Bestimmung des Nullstandards und der dreifachen Bestimmung des ersten Standards mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse berechnet. Sie liegt für diesen Assay bei 0,033 ng/ml.

5. Spezifität

Potentiell kreuzreagierende Substanzen wurden Plasmaproben zugefügt und mit dem Testsatz Renin bestimmt. Die Kreuzreaktion wurde nach Abraham ($x/y \times 100$) berechnet, wobei x und y die Menge von Angiotensin I und der kreuzreagierenden Substanz sind, die Bindung um 50 % reduziert:

Substanz	Kreuzreaktion (%)
Angiotensin I	100.00
Angiotensin II	<0.0023
Angiotensin III	0.02
Angiotensin Fragment 1-13	0.32
Angiotensin II Pentapeptid	0.015

with radioactive tracer (¹²⁵I-Angiotensin) for the binding sites of antibody. After incubation the amount of tracer bound to antibody will be inversely proportional to the amount of antigen present in standards or in samples. B/F separation is performed by addition of double antibody coupled to magnetic particles. The application of magnetic field allows the sedimentation of immunocomplexes, avoiding the centrifugation step.

The main steps of RIA assay are:

- incubation of reaction mixture for 18-20 hours at 4°C;
- B/F separation by adding double antibody coupled to magnetic particles;
- Decantation of supernatant;
- Counting of radioactivity in Gamma-counter.

4. REAGENTS

Do not interchange reagent from different kit lots. Lot numbers of reagents should be as stated on the "Certificate of Analysis". Do not use kit components beyond their expiration date.

The Renin kit contains sufficient reagents for 125 tubes. On receipt, store the kit at 2-8°C, until the expiration date on the label.

1. **Renin Tracer (Red), 1 vial:** Containing ¹²⁵I labelled Angiotensin I in phosphate buffer with bovine serum albumin and sodium azide 0.05% . 13.0 ml per vial. Maximum Radioactivity: 85 kBq. Expiry date is stated on vial label. The reagent is ready to use. Store at 2-8°C.
2. **Renin Calibrators, 8 vials:** Containing: 0- 0.2- 0.5- 1.0- 2.0- 5.0- 10.0- 25.0 ng/ml of lyophilized Angiotensin I in phosphate buffer with bovine serum albumin and sodium azide 0.2% w/v. Expiry date is stated on vial label. Reconstitute the contents of "0" standard with 2 ml distilled water and the other standards with 1 ml distilled water. Mix gently until the complete solubilization of freeze-dried residue. Store at 2-8°C for 1 day or at -20°C for longer length of time.
3. **Renin Antiserum, (color code green), 1 vial:** Containing lyophilized rabbit anti-Angiotensin I in phosphate buffer with rabbit gammaglobulin, bovine serum albumin, and sodium azide 0.05% w/v. Expiry date is stated on vial label. Reconstitute the contents of the vial with 12.5 ml distilled water and mix gently until the complete solubilization of freeze-dried residue. Store at 2-8°C for 3 days or at -20°C for longer length of time.
4. **Renin Separation Reagent, 1 vial:** Containing goat anti-rabbit gammaglobulin coupled to magnetic particles in Tris buffer with bovine serum albumin, and sodium azide <0.1 % w/v. 125 ml. Expiry date is stated on vial label. The solution is ready for use. Store at 2-8°C. Do not freeze.
5. **Renin Generation, Buffer pH 6.0, 1 vial:** Containing 6.0 ml phosphate buffer with yellow dye. Expiry date is stated on vial label. The suspension is ready for use. Store at 2-8°C. Do not freeze.
6. **Renin Generation Buffer, pH 7.4, 1 vial (Provided by request):** Containing 3.0 ml phosphate buffer with dyes (orange color). Expiry date is stated on vial label. The solution is ready for use. Store at 2-8°C. Do not freeze.
7. **Renin Enzyme Inhibitor, 1 vial:** Containing Phenilmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) in ethanol. 0.5 ml. Store at 2-8°C. If the solution crystallizes after 4°C storage, let it stand at 37°C in stoppered vial. Warning: Avoid to keep the open vial besides the use. The solution is ready for use.

5. WARNING AND PRECAUTIONS FOR USERS

For In Vitro diagnostic use.

Only experienced laboratory personnel should use this test and handling should be in agreement with GLP.

Radioactive Material - Not for Internal or External Use in Humans or Animals.

This radioactive material may be received, acquired, possessed, and used only by physicians, clinical laboratories or hospitals and only for *in vitro* clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation there from to human

beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations of each country.

Physical characteristics of ¹²⁵I : see end of instructions

1. **Safety Precautions:** The following precautions should be observed in handling radioactive material:
 - o Store radioactive materials in a designated area.
 - o Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where radioactive materials are being handled.
 - o Do not pipette by mouth.
 - o Wear gloves when handling radioactive materials and wash hands thoroughly afterwards.
 - o Cover working area with disposable absorbent paper.
 - o Wipe up all spills immediately and thoroughly and dispose of the contaminated materials as radioactive waste.
 - o Dispose of the liquid radioactive waste into the sanitary sewage system if permitted by the local regulations.
2. **Chemical Hazard - Sodium Azide (NaN₃) Warning:** Some of the reagents in this kit contain sodium azide as a preservative. For all such reagents, the concentration of sodium azide is <0.2%. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form explosive metal azides. Dispose of all non radioactive reagents by flushing with large amounts of water through the plumbing system.
Risk Phrases
R 21/22 Harmful in contact with skin and if swallowed.
Safety Phrases
S-26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S-28.1 After contact with skin, wash immediately with plenty of water.
S-46 If swallowed seek medical advice immediately and show the container or label.
3. **WARNING: Potential Biohazardous Material:** This kit contains some reagents made with human serum or plasma. The serum or plasma used has been tested by and FDA-approved method and found to be non-reactive for HIV-1/2 Antibodies, HCV and HBsAg. Because no method can offer complete assurance that HIV-1/2, HCV, HBsAg or other infectious agents are absent, these reagents should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 3rd Edition, 1993.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Draw specimen at room temperature. **Do not chill EDTA-Na₂ (2 mg/ml blood) collection tube or store the collection tube on ice.** Centrifuge the tube in a **non-refrigerated** centrifuge, and separate the plasma from the cells immediately after centrifugation, then aliquot and freeze immediately. Do not refrigerate. Cryoactivation, that is conversion of prorenin to renin, occurs when samples are chilled or exposed to temperatures of 6°C or lower for extended periods of time and when samples are chilled but remain in a liquid state (i.e not frozen) (12, 13). Before analysis samples should be thawed rapidly to room temperature by standing them in lukewarm water. Patients taking diuretics, antihypertensives, vasodilators, oral contraceptives, and licorice should discontinue use of these substances for two to four weeks before the test. It should be noted that renin is increased in pregnancy and in diets with reduced salt intake. Also, since renin is affected by body position, as well as by diurnal (daily) variation, blood samples should be drawn in the morning, and the position of the patient (sitting or lying down) should be noted. Eventual dilutions can be performed after Angiotensin I generation, using "0" standard supplied with the kit.

Warning:

- Do not use heparin as anticoagulant because it causes interference in Angiotensin I generation.
- Do not use hemolyzed samples.

7. ASSAY PROCEDURE

1. Materials Provided

The Renin Kit (R-EX-125) is sufficient for 125 tubes and contains the following reagents:

Reagents	Quantity
Renin Antiserum	1
Renin Standards	8
Renin Tracer	1
Renin Separation Reagent	1
Renin Generation Buffer pH 6.0	1
Renin Enzyme Inhibitor	1

2. Reagents Not Supplied with kit provided by request

Generation Buffer pH 7.4 - Code: R-EX-LC.

3. Materials and Equipment Required but not Provided

- Distilled water;
- Plastic test tubes (about 1 x 7);
- Water bath at 37°C;
- Graduates pipettes;
- Ice bath;
- Automatic micropipettes with disposable tips (0.01 - 0.1 ml);
- 4°C Refrigerator;
- Vortex Mixer;
- Permanent rack: 50 tubes disposable rack to be slid into Magnetic Separator;
- Magnetic Separator: Magnetic plate for B/F separation;
- Gamma-counter.

4. Test Procedure

4.1 Angiotensin I Generation

The user can choose the generation pH by using generation buffer pH 7.4 (orange solution - provided only by request) or generation buffer pH 6.0 (yellow solution - supplied with the kit).

In both the cases follow this procedure, add to plastic tubes, following the indicated order:

- 1.0 ml sample;
- 0.01 ml enzymatic inhibitor (PMSF);
- 0.1 ml buffer;
- Mix on vortex;

Prepare for each sample 4 tubes and put them in 2 Rack-:

- 2 tubes for 37°C incubation (marked with 37);
- 2 tubes for ice-bath incubation (marked with 4).

These tubes will be used for radioimmunoassay.

- pipette 0.1 ml sample treated with inhibitor in each tube. Put the 4 series in ice-bath and 37 series in water-bath at 37°C.
- incubation time is 3 hours if pH 7.4 generation buffer is used or 90 minutes if pH 6.0 generation buffer is used.
- at the end of incubation put 37 series tubes in ice-bath where 4 series tubes were kept. Then RIA is performed.

4.2 Radioimmunoassay Procedure

Put the following groups of tubes into ice-bath, together with the two series samples tubes:

- 2 tubes for total radioactivity;
- 2 tubes for NSB;
- 2 tubes for B0;
- 2 tubes for each standard concentration;
- Pipette 0.1 ml standard "0" into B0 tubes;
- Pipette 0.2 ml standard "0" into NSB tubes;
- Pipette 0.1 ml each standard into conveniently marked tubes;
- Add 0.1 ml Renin Tracer into all tubes;
- Add 0.1 ml Renin Antiserum into all tubes except into total radioactivity;
- Mix on vortex and incubate for 18-20 hours in ice-bath put in a refrigerator (4°C);
- At the end of incubation take the ice-bath out of the refrigerator and always keeping the tubes in ice-bath add 1 ml Renin Separation Reagent except to total radioactivity. During dispensing, the magnetic second antibody should be occasionally mixed to ensure the uniformity.
- Mix the whole rack on vortex; remove the rack from ice-bath and incubate for 10 minutes at room temperature. Remove total tubes from the rack and slide the rack into Magnetic Separator; control that the bottoms of tubes are in contact with the surface of separator.
- Allow the magnetic suspension to sediment for 10 minutes.

- Decant the tubes by inversion of magnetic separator; place the inverted separator on absorbent paper in order to remove the drops of liquid adhering to the sides of the tubes.
- Count all tubes, also total radioactivity, for 1 at least minute in Gamma-counter.

4.3 Assay Procedure Scheme - (The volumes are expressed in ml)

Reagents	Tubes	Sample "4"- "37"	B0	Standard	NSB	Total Radioactivity
Sample	0.1 - 0.1	-	-	-	-	-
"0" Standard	- -	0.1	-	-	0.2	-
Standards	- -	-	-	0.1	-	-
Tracer	0.1 - 0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Antiserum	0.1 - 0.1	0.1	0.1	0.1	-	-
Mix on vortex and incubate for 18-20 hours at 4°C in ice-bath to be placed in refrigerator. At the end of incubation, take the ice-bath with the tubes out of the refrigerator.						
Separation Reagent	1.0 1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-
Mix the rack on vortex and incubate for 10 minutes at room temperature. Remove total tubes. Slide the rack into Magnetic Separator and wait for 10 minutes. Count all tubes, also total radioactivity, for at least 1 minute in Gamma-counter.						

8. CALCULATIONS AND RESULTS

NSB mean counts may be subtracted from all mean counts except from total radioactivity.

B0 mean counts are used to calculate the % binding in absence of cold antigen (maximum binding).

$$\frac{\text{B0 mean counts}}{\text{Total radioactivity mean counts}} \times 100 = \% \text{ binding}$$

% relative binding of standard and samples is calculated with the following formula:

$$\frac{\text{Mean counts (standard, sample)}}{\text{B0 mean counts}} \times 100 = \% \text{ relative binding}$$

Draw the dose-response curve by plotting the % relative binding of each standard (y axis) against the relative concentration (x axis) using semilogarithmic paper.

By interpolating on the standard curve the % relative binding of each sample, one obtains the sample antigen concentration in ng/ml.

The plasmatic renin activity (PRA) is calculated as ng/ml/hour with the following formula:

$$\text{PRA} = \frac{(\text{ng/ml "37"} - \text{ng/ml "4"}) \times 1.11^*}{\text{Hours}^{**}} \text{ ng/ml/hour}$$

*1.11: Dilution factor of the sample after addition of PMSF and generation buffer.

**Hours: Incubation time for angiotensin I generation.

For data computerization we suggest to refer to bibliography (11, 12). The user can choose, according to assay characteristic, the calculation method and the graphic expression which allows the best data treatment.

1. Example of Calculation - Representative Standard Curve

Tubes	Mean cpm	B/T (%)	B/BO (%)	Concentration (ng/ml)
Total radioactivity	26114	-	-	-
NSB	274	1.05	-	-
B0	21217	81.25	-	-
St. 0.2 ng/ml	18458	-	86.8	-
St. 0.50 ng/ml	15002	-	70.3	-
St. 1.0 ng/ml	10906	-	50.8	-
St. 2.0 ng/ml	7060	-	32.4	-
St. 5.0 ng/ml	3551	-	15.6	-
St. 10.0 ng/ml	2077	-	8.6	-
St. 25.0 ng/ml	1064	-	3.8	-
Sample 1 ("4")	17053	-	80.12	0.31
Sample 1 ("37")	2103	-	8.73	9.84

$$\text{Sample 1} = \frac{(9.84 - 0.31) \times 1.11}{1.5} = 7.05 \text{ ng/ml/hour.}$$

INTERNAL QUALITY CONTROL

- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

9. LIMITATIONS

1. To obtain reliable results it is necessary to follow carefully the instruction reported in this package insert.
2. Do not use the reagents beyond the expiry date stated on vial labels.
3. Do not mix reagents from different lots.
4. After reconstitution, store the reagents at 4°C for 3 days in the stoppered vials. After reconstitution and storage at 4°C, the reagents can be used only once. For longer than 3 days storage, freeze the reagents at -20°C. After freezing, allow the reagents to reach room temperature gradually, avoiding to use water-bath at 37°C. Avoid to thaw the reagents more than once.
5. Samples contaminated with exogenous radioactivity may give inaccurate results.
6. Since angiotensin I generation is a linear function in the time, for samples supposed at low renin activity (less than 0.15 ng/ml/hour) it is possible to prolong generation time to increase assay sensitivity. In this way it is possible to read on standard curve a value which could be out of standard curve (see generation curve on section 8).
7. Plasmatic renin activity is closely correlated with sodium intake of the patient. It is necessary to evaluate both sodium urinary excretion and plasmatic renin activity to obtain a complete clinical state.

10. EXPECTED VALUES

Sample	Plasmatic renin activity ng/ml/hour	
	pH 6.0	pH 7.4
Erect	0.98 - 4.18	0.15 - 2.12
Supine	0.51 - 2.64	0.12 - 1.59

The range has been calculated on patients who have a urinary sodium excretion of about 100 mEq/24 hours. We suggest that each laboratory establishes its own normal range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Accuracy

Recovery studies were performed by adding Angiotensin I to pooled plasma samples. Angiotensin I values were determined before and after addition, and the % recovery of added Angiotensin calculated.

Sample	Angiotensin I Added (ng/ml)	Angiotensin I Measured (ng/ml)	Recovery %
1	0	1.4	-
	10	10.29	88.9
	5	6.17	95.3
	2	3.45	102.3
	1	2.43	103.0
2	0.5	1.94	107.0
	0	1.97	-
	10	12.22	102.5
	5	6.42	89.0
	2	3.85	94.3
3	1	2.97	100.7
	0.5	2.46	98.8
	0	3.21	-
	10	13.90	106.9
	5	8.25	100.8
	2	5.37	108.0
	1	4.30	109.0
	0.5	3.67	92.0

2. Dilution

In a dilution study, samples were diluted in Zero standard. Proceed to the dilution after angiotensin generation. The % recovery determined are shown below:

Sample	Dilution Factor	Angiotensin I Measured (ng/ml)	Recovery %
1	-	14.51	-
	2	7.38	101.7
	4	3.92	108.1
	8	1.83	101.1
	16	0.83	91.7
2	32	0.39	85.6
	-	19.74	-
	2	9.77	99.0
	4	5.11	103.5
	8	2.48	100.5
3	16	1.15	93.2
	32	0.6	97.3
	-	20.18	-
	2	9.66	95.7
	4	5.05	100.1
	8	2.51	99.5
	16	1.14	90.1
	32	0.62	97.7

3. Precision

Intra-Assay coefficient of variation (C.V.) was evaluated on serum pools measured 20 time in the same assay. The within-assay variability is shown below:

Sample	Mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. %
1	2.86	0.15	5.1
2	4.66	0.28	6.04
3	6.41	0.22	3.39

Inter-Assay coefficient of variation (C.V.) was evaluated at several points along the standard curve in 10 different assays. The between assay variability is shown below:

Sample	Mean (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. %
1	2.96	0.15	5.15
2	4.61	0.19	4.18
3	6.33	0.24	3.82

4. Sensitivity

The detection limit of the assay, defined as the concentration of Angiotensin I equivalent to the mean counts of 20 replicates of the Zero Standard less two standard deviations, is typically 0.033 ng/ml.

5. Specificity

The specificity of the Renin assay system was assessed by measuring the apparent response of the assay to potentially cross-reactive analytes. The percentage of interference was calculated according to Abraham's method ($x/y \times 100$) where x and y are respectively the weight of Angiotensin I and interfering compound that causes a decrease of 50% binding capacity.

Cross-Reactant	Cross-Reactivity
Angiotensin I	100.00 %
Angiotensin II	0.0023 %
Angiotensin III	0.02 %
Angiotensin Fragment 1-13	0.32 %
Angiotensin II Pentapeptide	0.015 %

ESPAÑOL

SÓLO PARA USO EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

R-EX-125 125 Determinaciones

1. USO PREVISTO

El kit emplea la técnica de radioinmunoensayo (RIA) para medir la actividad de la renina plasmática en plasma humano.

2. EXPLICACIÓN DEL TEST

El sistema renina-angiotensina-aldosterona es un sistema hormonal en "cascada", cuyo primer compuesto es el angiotensinógeno. La renina es una enzima proteolítica que convierte el angiotensinógeno en angiotensina I, un polipéptido sin actividad biológica. La angiotensina I es el sustrato sobre el que actúa la enzima de conversión para producir angiotensina II biológicamente activa, entre cuyas funciones biológicas más importantes se encuentran la vasoconstricción y la regulación de la síntesis y producción de aldosterona, que modifica el equilibrio electrolítico. Por consiguiente, este sistema interviene en la regulación de la tensión arterial mediante varios mecanismos. Para evaluar la actividad del sistema es posible medir la actividad de renina plasmática, ya que tanto el ensayo de angiotensina I como el de renina presentan problemas metodológicos (valores bajos en el caso de la angiotensina y presencia de enzimas estructuralmente similares en el caso de la renina). La renina es sintetizada por el aparato yuxtaglomerular del riñón y tiene un peso molecular aproximado de 40.000 daltones. Aunque la medición de su actividad se considera una herramienta válida para el pronóstico y tratamiento de la hipertensión arterial, es importante señalar que los resultados pueden variar a causa de una serie de factores: la ingestión de sodio, la posición (erguido o supina) y los fármacos. La actividad de la renina plasmática aumenta conforme se reduce la ingestión de sodio, y disminuye al cambiarse la posición erguida a la posición supina. Asimismo, existen fármacos que aumentan su actividad, como los diuréticos o los anticonceptivos por vía oral, y otros que la reducen, como la L-Dopa (larodopa) y la reserpina.

El hiperreninismo puede asociarse a los cuadros siguientes:

- Hiperreninismo con hipertensión arterial: hipertensión renovascular, tumor de Wilms y síndrome de Robertson-Kihara.
- Hiperreninismo sin hipertensión arterial: depleción de sodio, síndrome nefrótico y síndrome de Bartter.

El hiporreninismo puede asociarse a los cuadros siguientes:

- Hiporreninismo con hipertensión arterial: síndrome de Conn, pseudo-hiperaldosteronismo primario, síndrome de Biglieri y algunos casos de hipertensión esencial.
- Hiporreninismo sin hipertensión arterial: hipoadosteronismo, retención hidrosalina y disminución de la actividad del sistema nervioso simpático.

En determinados casos puede resultar útil evaluar los cambios ocurridos en la actividad de la renina plasmática tras realizar pruebas dinámicas, entre las que destaca la estimulación de furosemida.

3. PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El kit permite determinar la actividad de la renina plasmática mediante el radioinmunoensayo de angiotensina I. Antes de realizar el radioinmunoensayo, es preciso incubar el plasma para que la renina genere angiotensina I en condiciones estándar. Durante la fase de generación, un inhibidor enzimático evita la degradación enzimática de la angiotensina I.

En este procedimiento se prevé la posibilidad de elegir el pH de generación.

El kit permite generar el plasma a dos pH diferentes:

- Tampón de generación a pH 6,0: frasco suministrado con el conjunto de reactivos
- Tampón de generación a pH 7,4: frasco suministrado a petición solamente

En el proceso de generación a pH 7,4 intervienen los mismos procesos fisiológicos del ser humano, en los que se bloquea la actividad de otras enzimas del plasma.

En comparación con el método a pH 7,4, el método a pH 6,0 se considera más fiable para muestras con escasa actividad de renina porque se obtiene una cantidad dos veces superior. Debido a que la

generación de angiotensina se comporta como una función lineal en el tiempo, se obtienen los mismos resultados al cambiar el tiempo de generación. Sin embargo, a fin de normalizar el proceso y garantizar una buena precisión, este procedimiento prevé un tiempo de incubación de 90 minutos a pH 6,0 y de 3 horas a pH 7,4. El radioinmunoensayo se efectúa tras la fase de generación. El antígeno de los estándar o muestras compete con el isótopo radioactivo (angiotensina I¹²⁵) por los sitios de unión del anticuerpo. Tras la incubación, la cantidad de isótopo radioactivo unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de antígenos presente en los estándar o en las muestras. La fracción unida se separa de la fracción libre mediante la adición del doble anticuerpo asociado a partículas magnéticas. La aplicación de un campo magnético hace posible la sedimentación del inmunocomplejo, y evita el centrifugado.

Los pasos más importantes de este ensayo RIA son los siguientes:

- Incubación de la mezcla reactiva durante 18-20 horas a 4°C
- Separación de la fracción unida y la fracción libre mediante la adición del doble anticuerpo asociado a partículas magnéticas
- Decantación del líquido sobrenadante
- Medición de radioactividad en un contador de rayos gamma

4. REACTIVOS

No utilice reactivos de lotes diferentes. Consulte los números de lote en el "Certificado de Análisis". No utilice los componentes del kit después de la fecha de caducidad.

El kit Renin contiene reactivos suficientes para 125 tubos. Conserve el kit a una temperatura de 2 a 8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

1. **1 frasco de Isótopo Radioactivo Renin:** El frasco contiene angiotensina I marcada con I¹²⁵ en tampón fosfato con albúmina sérica bovina y azida sódica al 0,05%. 13,0 ml por frasco. Radioactividad máxima: 85 kBq. La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del frasco. El reactivo está listo para el uso. Conservarlo a una temperatura de 2 a 8°C.
2. **8 frascos de Estándar Renin:** Los frascos contienen 0- 0,2- 0,5- 1,0- 2,0- 5,0- 10,0- 25,0 ng/ml de angiotensina I liofilizada en tampón fosfato con albúmina sérica bovina y azida sódica al 0,2%. La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del frasco. Reconstituya el contenido del frasco de estándar "0" con 2 ml de agua destilada, y utilice 1 ml de agua destilada para reconstituir los demás estándar. Mezcle con suavidad hasta la total solubilización de los residuos de suero liofilizado. Puede conservarlo durante 1 día a una temperatura de 2 a 8°C, o a -20°C durante un periodo de tiempo prolongado.
3. **1 frasco de Antisuero Renin (código de color verde):** El frasco contiene anti-angiotensina I de conejo liofilizada en tampón fosfato con gammaglobulinas de conejo, albúmina sérica bovina y azida sódica al 0,05%. La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del frasco. Reconstituya el contenido del frasco con 12,5 ml de agua destilada y mezcle con suavidad hasta la total solubilización de los residuos de suero liofilizado. Puede conservarlo durante 3 días a una temperatura de 2 a 8°C, o a -20°C durante un periodo de tiempo prolongado.
4. **1 frasco de Reactivo de Separación Renin:** El frasco contiene gammaglobulinas de cabra anticonejo asociadas a partículas magnéticas en tampón Tris con albúmina sérica bovina y azida sódica al <0,1%. 125 ml. La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del frasco. La solución está lista para el uso. Conserve a una temperatura de 2 a 8°C. No congelar.
5. **1 frasco de Tampón de Generación a pH 6,0 Renin:** El frasco contiene 6,0 ml de tampón fosfato con colorante amarillo. La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del frasco. La suspensión está lista para el uso. Conserve a una temperatura de 2 a 8°C. No congelar.
6. **1 frasco de Tampón de Generación a pH 7,4 Renin (Suministrado a petición):** El frasco contiene 3,0 ml de tampón fosfato con colorantes (color naranja). La fecha de caducidad se indica en la etiqueta del frasco. La solución está lista para el uso. Conserve a una temperatura de 2 a 8°C. No congelar.

7. **1 frasco de Inhibidor Enzimático Renin :** El frasco contiene fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) en etanol. 0,5 ml. Conserve a una temperatura de 2 a 8°C. Si la solución se cristaliza tras permanecer guardada a 4°C, déjela que repose en el frasco herméticamente sellado a 37°C. Advertencia: No deje el frasco abierto si no lo está utilizando. La solución está lista para el uso. Conserve a una temperatura de 2 a 8°C. Si la solución se cristaliza tras permanecer guardada a una temperatura de entre 2 y 8°C, déjela que repose en el frasco herméticamente sellado a 37°C.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA EL USUARIO

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Esta prueba sólo debe realizarla personal de laboratorio con experiencia y de acuerdo con GLP.

Material radioactivo. Se recomienda evitar su administración por vía interna o externa a seres humanos o animales.

La compra, solicitud, posesión y uso de este material radioactivo sólo se autoriza a médicos, laboratorios clínicos u hospitales con el propósito exclusivo de realizar pruebas clínicas y de laboratorio *in vitro* que no conlleven la administración del material por vía interna o externa, ni la exposición de seres humanos o animales a sus radiaciones. Su compra, solicitud, posesión, uso y transferencia están sujetos a las normativas de cada país.

Características físicas ¹²⁵I : se encuentran al final

1. **Medidas de seguridad:** Al manipular material radioactivo es conveniente aplicar las siguientes medidas:
 - o Guarde el material radioactivo en las zonas destinadas a este fin.
 - o No coma, beba, fume ni se maquille en zonas en las que se manipulen materiales radioactivos.
 - o No utilice la pipeta con la boca.
 - o Utilice guantes para manipular materiales radioactivos y lávese bien las manos cuando termine.
 - o Cubra el área de trabajo con papel secante desechable.
 - o Limpie bien el líquido derramado de inmediato y deseche los materiales contaminados de la misma forma que los residuos radioactivos.
 - o Si las normativas locales lo permiten, puede eliminar los residuos radioactivos líquidos a través del sistema municipal de alcantarillado.
2. **Riesgos químicos de la azida sódica (NaN₃):** Algunos de los reactivos incluidos en este kit contienen una concentración de azida sódica al <0,2% como conservante. Dado que la azida sódica puede dar lugar a la formación de azidas explosivas de cobre o plomo en las tuberías, se recomienda eliminar los reactivos no radioactivos a través del desagüe mediante abundantes descargas de agua.

Frases de Riesgo
R 21/22 Nocivo en contacto con la piel y por ingestión

Frases de Seguridad
S-26 En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
S-28.1 En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.
S-46 En caso de ingestión, acuda inmediatamente al médico y muéstrela la etiqueta o el envase.
3. **Material con posible riesgo biológico:** Este kit contiene algunos reactivos elaborados con suero o plasma humano. El resultado obtenido con el método de prueba aceptado por la FDA (Organismo para el control de Alimentos y Medicamentos de EE.UU.) demuestra que el plasma o suero utilizado no es reactivo para anticuerpos HIV-1/2, HCV y HBsAg. Dado que no existe ningún método que garantice la total ausencia de anticuerpos HIV-1/2, HCV y HbsAg, u otros agentes infecciosos, es preciso aplicar el nivel de seguridad biológica 2 al manipular estos reactivos, de conformidad con las recomendaciones relacionadas con las muestras de suero o sangre humana potencialmente infecciosas del manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Seguridad biológica en laboratorios microbiológicos y biomédicos), 3ª Edición, 1993, publicado por los Centros de Control de Enfermedades y el Instituto Nacional de la Salud.

6. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

Extraiga la muestra a temperatura ambiente. **No enfríe ni ponga en hielo el tubo de extracción con EDTA-Na₂ (2 mg/ml de sangre).** Centrifugue el tubo en un centrifugador **no refrigerado**, separe el plasma de las células inmediatamente después del centrifugado y, a continuación, fraccione y congele la muestra lo antes posible. No refrigerar. La crioactivación, o conversión de la prorenina en renina, se produce al enfriar o exponer las muestras a temperaturas de 6°C o inferiores durante periodos de tiempo prolongados, y cuando las muestras se enfrían pero permanecen en estado líquido (es decir, cuando no se congelan) (12, 13). Antes del análisis es preciso introducir las muestras en agua tibia para que se descongelen rápidamente hasta que alcancen la temperatura ambiente. Los pacientes tratados con diuréticos, antihipertensivos, vasodilatadores, anticonceptivos orales y glicirricina deben interrumpir el tratamiento entre dos y cuatro semanas antes del examen. Debe tenerse en cuenta que los niveles de renina aumentan durante el embarazo y cuando se siguen dietas con menor ingestión de sal. Asimismo, como en la medición de renina influyen tanto la posición corporal como las variaciones diurnas, es aconsejable extraer las muestras de sangre durante la mañana y anotar la posición del paciente (si está sentado o tumbado). Las muestras pueden diluirse con el estándar "0" suministrado en el kit una vez generada la angiotensina I.

Advertencia:

- No utilice herapina como anticoagulante, ya que interfiere en la generación de angiotensina I.
- No utilice muestras hemolizadas.

7. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

1. Materiales suministrados

El kit Renin (código R-EX-125), suficiente para 125 tubos, contiene los siguientes reactivos:

Reactivo	Cantidad
Antisuero Renin	1 frasco
Estándar Renin	8 frascos
Isótopo radioactivo Renin	1 frasco
Reactivo de separación Renin	1 frasco
Tampón de generación a pH 6,0 Renin	1 frasco
Inhibidor enzimático Renin	1 frasco

2. Reactivos no suministrados con el kit que pueden pedirse

Tampón de generación a pH 7,4, código R-EX-LC.

3. Materiales y equipo necesarios no suministrados

- Agua destilada
- Tubos de ensayo de plástico (1 x 7 cm aproximadamente)
- Baño maría a 37°C
- Pipetas graduadas
- Baño helado
- Micropipetas automáticas con punta desechable (0,01 - 0,1 ml)
- Refrigerador a 4°C
- Mezclador vortical
- Soporte permanente : soporte para 50 tubos que se desliza en el separador magnético
- Separador magnético: placa magnética para separar la fracción unida de la fracción libre
- Contador de rayos gamma

4. Procedimiento de ensayo

4.1. Generación de angiotensina I

Mediante el tampón de generación a pH 7,4 (solución naranja, suministrada a petición exclusivamente) o a pH 6,0 (solución amarilla suministrada con el kit), puede elegir el pH de la angiotensina.

En ambos casos debe seguir este procedimiento en el orden indicado:

- Añada 1,0 ml de muestra a los tubos de plástico.
- Añada 0,01 ml de inhibidor enzimático (PMSF) a los tubos de plástico.
- Añada 0,1 ml de tampón a los tubos de plástico.
- Aplique la mezcla vortical.

Prepare 4 tubos por cada muestra y colóquelos en 2 soportes :

- 2 tubos para la incubación a 37°C (con la marca 3 7)
- 2 tubos para la incubación en baño helado (con la marca 4)

Estos tubos se utilizarán en el radioinmunoensayo.

- Con la pipeta, introduzca 0,1 ml de la muestra tratada con inhibidor en cada tubo. Coloque los tubos de la serie 4 en un baño helado y los de la serie 37 al baño maría a 37°C.
- El intervalo de incubación es de 3 horas si se utiliza tampón de generación a pH 7,4, y de 90 minutos en el caso del tampón de generación a pH 6,0.
- Al final del intervalo de incubación, coloque los tubos de la serie 37 en el baño helado que utilizó con los tubos de la serie 4. A continuación, proceda con el radioinmunoensayo.

4.2. Procedimiento de radioinmunoensayo

Coloque los grupos de tubos siguientes en el baño helado, junto con los tubos de muestras de ambas series:

- 2 tubos para el recuento de radioactividad total
- 2 tubos para UNE
- 2 tubos para B0
- 2 tubos para cada concentración estándar
- Introduzca 0,1 ml de estándar "0" en los tubos B0 con ayuda de la pipeta.
- Introduzca 0,2 ml de estándar "0" en los tubos UNE con la pipeta.
- Dispense con la pipeta 0,1 ml de cada estándar en los tubos convenientemente marcados.
- Añada 0,1 ml de isótopo radioactivo Renin a todos los tubos.
- Dispense 0,1 ml de antisuero Renin en todos los tubos, excepto los tubos que permiten determinar la radioactividad total.
- Aplique la mezcla vortical e incube durante 18-20 horas en un baño helado entro de un refrigerador (4°C).
- Cuando termine el intervalo de incubación, saque el baño helado del refrigerador y, sin sacar los tubos del baño, añada 1 ml de reactivo de separación Renin a los tubos, excepto los que permiten medir la radioactividad total. Durante esta operación es preciso mezclar el segundo anticuerpo magnético de vez en cuando para garantizar una distribución uniforme.
- Aplique la mezcla vortical a todo el soporte, extraiga el soporte del baño helado e incube durante 10 minutos a temperatura ambiente. Quite todos los tubos del soporte, deslice el soporte en el separador magnético y asegúrese de que la base de todos los tubos está en contacto con la superficie del separador.
- Deje que la suspensión magnética se sedimente durante 10 minutos.
- Decante el líquido de los tubos invirtiendo el separador magnético, y coloque el separador invertido sobre papel secante para que salga el líquido adherido a las paredes de los tubos.
- Introduzca todos los tubos en un contador de rayos gamma durante al menos 1 minuto, incluidos los tubos utilizados para determinar la radioactividad total.

4.3. Esquema del ensayo (volumen expresado en ml)

Reactivos	Tubos	Muestra "4"- "37"	B0	Estándar	UNE	Radioacti. Total
Muestra	0,1	0,1	0,1	-	-	-
Estándar "0"	-	-	-	0,1	0,2	-
Estándar	-	-	-	-	-	-
Isótopo radioactivo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Antisuero	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
Aplique la mezcla vortical e incube durante 18-20 horas a 4°C en un baño helado dentro de un refrigerador. Al final del intervalo de incubación, saque del refrigerador el baño helado con los tubos.						
React. Separación	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
Agite el soporte mediante la técnica vortical e incube a temperatura ambiente durante 10 minutos. Quite todos los tubos. Deslice el soporte en el separador magnético y espere 10 minutos. Introduzca todos los tubos en un contador de rayos gamma durante al menos 1 minuto, incluidos los de recuento total.						

8. CÁLCULO DE RESULTADOS

El valor medio de desintegraciones de UNE (unión no específica) puede restarse de todos los valores promedio, a excepción de la radioactividad total.

El valor medio de desintegraciones de B0 permite calcular el porcentaje de unión en ausencia de antígeno frío (unión máxima).

$$\frac{\text{Media de desintegración B0}}{\text{Media de desintegración radioactiva total}} \times 100 = \% \text{ de unión}$$

El porcentaje de unión relativa de cada estándar y muestra se calcula con la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Media de desintegraciones (estándar, muestra)}}{\text{Media de desintegración B0}} \times 100 = \% \text{ de unión relativa}$$

Para dibujar la curva de respuesta a la dosis, trace en papel semilogarítmico el porcentaje de unión relativa de cada estándar (eje y) en función de la concentración relativa (eje x).

Mediante la interpolación en la curva estándar del porcentaje de unión relativa de cada muestra puede hallar la concentración de antígenos de la muestra, expresada en ng/ml.

La fórmula siguiente permite calcular la actividad de la renina plasmática (ARP) como ng/ml/hora:

$$\text{ARP} = \frac{(\text{ng/ml "37"} - \text{ng/ml "4"}) \times 1,11^*}{\text{Horas}^{**}} \text{ ng/ml/hora}$$

*1,11: Factor de dilución de la muestra tras añadir PMSF y tampón de generación.

**Horas: Tiempo de incubación para la generación de angiotensina I.

Consulte la información relacionada con el cálculo automatizado de datos en la bibliografía (11, 12). Puede elegir el método de cálculo y la representación gráfica que garantiza un tratamiento de datos óptimo en función de las características del ensayo.

1. Ejemplo de cálculo de una curva estándar representativa

Tubos	Dpm media	B/T (%)	B/BO (%)	Concentración (ng/ml)
Radioactividad Total	26114	-	-	-
NSB	274	1,05	-	-
B0	21217	81,25	-	-
St. 0.2 ng/ml	18458	-	86,8	-
St. 0.50 ng/ml	15002	-	70,3	-
St. 1.0 ng/ml	10906	-	50,8	-
St. 2.0 ng/ml	7060	-	32,4	-
St. 5.0 ng/ml	3551	-	15,6	-
St. 10.0 ng/ml	2077	-	8,6	-
St. 25.0 ng/ml	1064	-	3,8	-
Muestra 1 ("4")	17053	-	80,12	0,31
Muestra 1 ("37")	2103	-	8,73	9,84

$$\text{Muestra 1} = \frac{(9,84 - 0,31) \times 1,11}{1,5} = 7,05 \text{ ng/ml/hora}$$

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, los cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los duplicados de los resultados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

9. LIMITACIONES

1. Para obtener resultados fiables es necesario seguir estrictamente las instrucciones incluidas en el folleto del envase.
2. No utilice los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del frasco.
3. No utilice reactivos de lotes diferentes.
4. Una vez reconstituidos, los reactivos pueden conservarse durante 3 días a 4°C si los frascos están herméticamente sellados. Una vez reconstituidos y conservados a 4°C, los reactivos sólo pueden utilizarse una vez. Para conservarlos más de 3 días, manténgalos a una temperatura de -20°C. Los reactivos congelados deben descongelarse de forma gradual a temperatura ambiente. No los ponga al baño maría a 37°C.
No descongele las muestras más de una vez.
5. Las muestras contaminadas con la radioactividad originada por causas externas pueden dar lugar a resultados inexactos.
6. Como la generación de la angiotensina I es una función lineal en el tiempo, el periodo de generación puede prolongarse para aumentar la sensibilidad del ensayo con muestras en las que se sospecha que existe una escasa actividad de la renina (inferior a 0,15 ng/ml/hora). Debido a esto, es posible que en la curva estándar aparezca un valor que podría no estar incluido (consulte la curva de generación en la sección 4).
7. La actividad de la renina plasmática está estrechamente relacionada con la ingestión de sodio. Por consiguiente, es necesario evaluar tanto la excreción de sodio por la orina como la actividad de la renina plasmática si se quiere tener una idea exacta del estado clínico.

10. VALORES ESPERADOS

Maestra	ARP ng/ml/hora	
	pH 6,0	pH 7,4
Erguido	0,98 - 4,18	0,15 - 2,12
Supina	0,51 - 2,64	0,12 - 1,59

Para calcular el rango se han seleccionado pacientes con una excreción de sodio por la orina de aproximadamente 100 mEq/24 horas. Es aconsejable que cada laboratorio defina un rango de valores normales propio.

11. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

1. Acuracidad

En los estudios de recuperación realizados se añadió angiotensina I a un pool de muestras de plasma. Los valores de angiotensina I se determinaron antes y después de añadir esta sustancia, para luego calcular el porcentaje de recuperación de la angiotensina añadida.

Muestra	Angiotensina I Añadida (ng/ml)	Angiotensina I Medida (ng/ml)	% de Recuperación %
1	0	1,4	-
	10	10,29	88,9
	5	6,17	95,3
	2	3,45	102,3
	1	2,43	103,0
	0,5	1,94	107,0
2	0	1,97	-
	10	12,22	102,5
	5	6,42	89,0
	2	3,85	94,3
	1	2,97	100,7
	0,5	2,46	98,8
3	0	3,21	-
	10	13,90	106,9
	5	8,25	100,8
	2	5,37	108,0
	1	4,30	109,0
	0,5	3,67	92,0

2. Dilución

En el estudio de dilución, las muestra se diluyeron en estándar cero después de generar la angiotensina. El porcentaje de recuperación determinado se muestra a continuación:

Muestra	Dilución Factor	Angiotensina I Medida (ng/ml)	% de Recuperación
1	-	14,51	-
	2	7,38	101,7
	4	3,92	108,1
	8	1,83	101,1
	16	0,83	91,7
	32	0,39	85,6
2	-	19,74	-
	2	9,77	99,0
	4	5,11	103,5
	8	2,48	100,5
	16	1,15	93,2
	32	0,6	97,3
3	-	20,18	-
	2	9,66	95,7
	4	5,05	100,1
	8	2,51	99,5
	16	1,14	90,1
	32	0,62	97,7

3. Precisión

El coeficiente de variación intraensayo (CV) se ha evaluado en pools de suero medidos 20 veces durante el ensayo. La variabilidad intraensayo es la siguiente:

Muestra	Media (ng/ml)	SD (ng/ml)	C.V. %
1	2,86	0,15	5,1
2	4,66	0,28	6,04
3	6,41	0,22	3,39

El coeficiente de variación interensayo (CV) se evaluó en distintos puntos de la curva estándar en 10 ensayos diferentes. La variabilidad interensayo es la siguiente:

Muestra	Media (ng/ml)	SD (ng/ml)	C.V. %
1	2,96	0,15	5,15
2	4,61	0,19	4,18
3	6,33	0,24	3,82

4. Sensibilidad

El límite de detección del ensayo, definido como la concentración de angiotensina I equivalente a la media de desintegraciones de 20 duplicados del estándar cero menos 2 desviaciones típicas (SD) de cero, es 0,033 ng/ml.

5. Especificidad

Para evaluar la especificidad del sistema de ensayo Renin se ha medido la respuesta aparente del mismo ante la presencia de analitos que podrían producir una reacción cruzada. El porcentaje de interferencia se ha calculado de acuerdo con el método de Abraham ($x/y \times 100$), donde x e y corresponden respectivamente al peso de la angiotensina I y del compuesto de interferencia que reduce la capacidad de unión en un 50%.

Reactivo cruzado	Reactividad cruzada
Angiotensina I	100.00 %
Angiotensina II	0.0023 %
Angiotensina III	0.02 %
Angiotensina, fragmento 1-13	0.32 %
Angiotensina II, pentapéptido	0.015 %

FRANÇAIS

UNIQUEMENT POUR UTILISATION IN VITRO

R-EX-125 125 Déterminations

1. UTILISATION DU PRODUIT

Le kit permet de déterminer l'activité rénine plasmatique dans des échantillons de plasma humain (EDTA) par une méthode radioimmunologique.

2. SIGNIFICATION DU DOSAGE

Le système rénine-angiotensine-aldostérone représente un système hormonal «en cascade»; son premier élément est l'angiotensinogène. L'hormone protéolytique rénine agit sur ce système, déterminant la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine I, un polypeptide qui est en soi dépourvu d'action biologique. L'angiotensine I est le substrat sur lequel agit l'enzyme de conversion qui détermine la production d'angiotensine II, qui est elle biologiquement active. Les actions biologiques de ce polypeptide consistent à provoquer la vasoconstriction, la régulation de la synthèse et la sécrétion d'aldostérone qui participe à son tour à l'équilibre électrolytique.

Ce système est donc en mesure de moduler la pression artérielle par plusieurs mécanismes. Du point de vue analytique, la mesure de l'activité de ce système est rendue possible par l'évaluation de l'activité rénine plasmatique, car le dosage de l'angiotensine II et le dosage de la concentration rénine rencontrent des problèmes d'ordre méthodologique (concentrations très basses pour la première, présence d'enzymes chimiquement semblables pour la seconde). La rénine est produite par l'appareil juxtaglomérulaire du rein et présente un poids moléculaire d'environ 40 000 Dalton. L'évaluation de son activité constitue une aide importante pour le pronostic et la thérapie de sujets atteints d'hypertension artérielle. Toutefois, pour une bonne évaluation de l'activité rénine plasmatique, il est nécessaire de connaître certains facteurs pouvant moduler les valeurs, comme par exemple: l'apport en sodium, la posture et les médicaments administrés. La valeur de l'activité rénine augmente lorsque l'apport en sodium diminue, et se réduit lors du passage de la position debout à la position décubitus. De plus, certains types de médicaments, comme les diurétiques ou les contraceptifs, peuvent provoquer une élévation de l'activité rénine plasmatique, tandis que d'autres, comme la L-Dopa ou la réserpine, peuvent diminuer les valeurs de l'activité rénine. Une augmentation de l'activité rénine plasmatique peut être due aux situations suivantes:

- hyperréninisme avec hypertension artérielle, hypertension rénale vasculaire, tumeur de Wilms, syndrome de Robertson-Kihara.
- hyperréninisme sans hypertension artérielle, carence de sodium, syndrome néphrosique, syndrome de Bartter.

Une diminution de l'activité rénine plasmatique peut être due aux situations suivantes:

- hyporéninisme avec hypertension artérielle, maladie de Conn, pseudo-hyperaldostéronisme primaire, syndrome de Biglieri, certains cas d'hypertension artérielle essentielle.
- hyporéninisme sans hypertension artérielle, hypoaldostéronisme, rétention hydro-saline, faible activité du système nerveux sympathique.

Dans certains cas, il peut s'avérer utile d'évaluer les changements de l'activité rénine plasmatique après stimulation. L'un des tests les plus utilisés est la stimulation par furosémide.

3. PRINCIPE DE LA METHODE

La méthode permet de déterminer l'activité rénine plasmatique par le dosage radioimmunologique de l'angiotensine I. Il est nécessaire d'effectuer une incubation des plasmas avant le dosage radioimmunologique, de façon à ce que la rénine standardisée génère de l'angiotensine I. La présence d'inhibiteurs enzymatiques durant cette phase évite la dégradation enzymatique de l'angiotensine. La méthode offre à l'utilisateur la possibilité de choisir le pH de génération de l'angiotensine I. Le kit fournit la possibilité d'effectuer la génération des échantillons de plasma à pH 6,0, en utilisant le tampon fourni dans le kit, ou à pH 7,4, avec le tampon disponible uniquement sur demande. La génération à pH 7,4 est semblable au processus qui a lieu dans la physiologie humaine, bloquant l'éventuelle activité d'autres

enzymes protéolytiques présents dans le plasma. La génération à pH 6,0 produit une quantité d'angiotensine double par rapport à celle qui est obtenue à pH 7,4, ce qui rend la méthode plus sensible, surtout pour les échantillons à faible activité rénine. La génération est une fonction linéaire dans le temps, on obtient donc des résultats constants en variant les durées de génération. Pour pouvoir standardiser la procédure en garantissant une bonne capacité de répétition, la méthode prévoit d'incuber pendant 90 minutes à 37°C si l'on travaille à pH 6,0 ou pendant 3 heures si l'on travaille à pH 7,4. Après la phase de génération, l'on procède au dosage radioimmunologique. L'antigène présent dans les étalons et dans les échantillons est relevé par le traceur radioactif (¹²⁵-Angiotensin) pour les zones de liaison de l'anticorps. Après l'incubation, la quantité de traceur qui se lie à l'anticorps est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène présente dans les étalons et les échantillons. La séparation B/F est effectuée après adjonction d'un double anticorps insolubilisé sur des particules magnétiques. L'application d'un champ magnétique permet la précipitation de l'immunocomplexe, évitant ainsi la centrifugation.

Les phases principales du dosage RIA sont:

- Incubation du mélange de réaction pendant 18 à 20 heures à 4°C.
- Séparation de l'immunocomplexe par adjonction du second anticorps insolubilisé sur des particules magnétiques.
- Décantation du surnageant.
- Compte de la radioactivité dans un compteur à rayons gamma.

4. REACTIFS - Préparation et Conservation

Ne pas utiliser de réactifs de lots différents. Les numéros de lots des réactifs doivent correspondre à ceux qui sont déclarés sur le «Certificat d'analyse». Ne pas utiliser le kit lorsque la date de péremption est dépassée.

Le kit Renin contient des réactifs suffisants pour 125 tubes. A la réception du kit, le conserver à une température comprise entre 2 et 8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

1. **1 flacon de Renin Traceur (Rouge):** Contient de l'angiotensine I marquée ¹²⁵ dans un tampon phosphate avec de l'albumine bovine et du nitru de sodium (0,05%). 13,0 ml par flacon. Radioactivité max.: 85 kBq. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du flacon. Le réactif est prêt à l'emploi. Conserver à 2-8°C.
2. **8 flacons de Renin Calibrateurs:** Contiennent respectivement, sous forme lyophilisée: 0- 0.2- 0.5- 1.0- 2.0- 5, 10.0- 25.0 ng/ml d'angiotensine I dans un tampon phosphaté avec de l'albumine bovine et du nitru de sodium (<0,2%). La date de péremption est indiquée sur l'étiquette des flacons. Reconstituer le contenu des flacons étalon «0» avec 2 ml d'eau distillée et les étalons restants avec 1 ml d'eau distillée. Mélanger délicatement jusqu'à complète solubilisation du lyophilisé. Conserver à 2-8°C pendant 1 jour, à -20°C pour les périodes plus longues.
3. **1 flacon de Renin Antisérum (vert):** Contient de l'anti-sérum anti-angiotensine (obtenu chez un lapin) sous forme lyophilisée dans un tampon phosphate avec de la gammaglobuline de lapin, de l'albumine bovine et du nitru de sodium (0,05%). La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du flacon. Reconstituer le contenu du flacon avec 12,5 ml d'eau distillée et mélanger délicatement, jusqu'à complète solubilisation du lyophilisé. Conserver à 2-8°C pendant 3 jours, à -20°C pour les périodes plus longues.
4. **1 flacon de Renin Agent de Séparation:** Le flacon contient de l'antisérum anti-gammaglobuline de lapin (obtenu chez la chèvre) insolubilisé sur des particules magnétisables, dans un tampon Tris avec de l'albumine bovine et du nitru de sodium (<0,1 % p/p). 125 ml La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du flacon. La suspension est prête à l'emploi. Conserver à 2-8°C. Ne pas congeler.
5. **1 flacon de Renin Inhibiteur enzymatique:** Contient du phénylméthylsulfonyl fluorure dans de l'éthanol. 0,5 ml. Attention : éviter de garder le flacon ouvert plus longtemps que nécessaire pour l'utilisation. La solution est prête à l'emploi. Conserver à 2-8°C. Si la solution tend à se cristalliser, après la conservation à 4°C, il est conseillé de la porter à 37°C pendant quelques minutes dans un flacon fermé.

6. **1 flacon de Renin Tampon de génération pH 6.0:** Contient un tampon phosphate. 6,0 ml. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du flacon. La solution est prête à l'emploi. Conserver à 2-8°C. Ne pas congeler.

7. **1 flacon de Renin Tampon de génération pH 7.4 (disponible sur demande):** Contient un tampon phosphate. 3 ml. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du flacon. La solution est prête à l'emploi. Conserver à 2...8°C. Ne pas congeler.

5. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS D'EMPLOI

Ce matériel doit exclusivement être utilisé à des fins de diagnostic *in vitro*.

Le kit est destiné pour une utilisation professionnelle et uniquement à utiliser par le personnel du laboratoire, en conformité aux normes GLP.

Caractéristiques physiques de ¹²⁵I : voir fin de la notice

1. **Précautions: Matériel radioactif - Ne pas administrer par voie interne ou externe à des êtres humains ou des animaux.**

Le matériel radioactif ne peut être acheté, commandé et détenu que par du personnel médical, des laboratoires d'analyse, des hôpitaux et uniquement à des fins de diagnostic IN VITRO. Il ne doit en aucun cas être administré par voie interne ou externe à des êtres humains ou des animaux. La réception, l'achat, la possession, l'utilisation et le transfert de ce matériel est soumis à des réglementations qui peuvent être différentes dans chaque pays.

Mesures de précautions pour l'utilisation de matériel radioactif :

- o Conserver le matériel radioactif dans un endroit prévu à cet effet.
- o Ne pas manger, boire, fumer ou appliquer de cosmétiques dans les zones destinées à l'utilisation de matériaux radioactifs.
- o Ne pas pipeter la solution radioactive avec la bouche.
- o Porter des gants pour manipuler du matériel radioactif et soigneusement se laver les mains après son utilisation.
- o Couvrir la zone de travail à l'aide de papier absorbant jetable.
- o Toute perte accidentelle de produit radioactif doit être traitée selon les procédures établies.
- o Tous les matériaux radioactifs doivent être éliminés selon des systèmes d'élimination conformes aux dispositions prévues par les organismes de contrôle ayant juridiction sur le laboratoire.

2. **Risque chimique - nitru de sodium (NaN₃):** Le nitru de sodium est employé dans les réactifs du kit à une concentration finale ne dépassant pas 0.2% p/p. Le nitru de sodium peut réagir avec les tuyaux d'évacuation en plomb et en cuivre en formant des azides métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination du produit, rincer abondamment à l'eau pour éviter l'accumulation d'azides. Le nitru de sodium est un poison. Il peut être létal s'il est ingéré. Ne pas pipeter avec la bouche le matériel contenant du nitru de sodium. Manipuler avec précaution et éviter le contact avec la peau. Se laver les mains après avoir travaillé avec du matériel contenant du nitru de sodium.

Phrases de risque

R-21/22 Dangereux si le produit entre en contact avec la peau ou s'il est ingéré

Phrases de sécurité

S-26 En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement avec une grande quantité d'eau et consulter un médecin.

S-28.1 Après le contact avec les yeux, rincer immédiatement avec une grande quantité d'eau.

S-46 En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer le récipient ou l'étiquette.

3. **Risque biologique - sérum humain:** Le kit contient des réactifs préparés à l'aide de sérum ou de plasma humain. Le sérum et le plasma employés ont été testés selon une méthode approuvée par la FDA. Ils sont négatifs à la présence d'anticorps HIV-1/2, HCV et HbsAg. Toutefois, aucune méthode ne permet d'établir avec certitude que le HIV-1/2, HCV, HbsAg ou d'autres agents infectieux sont absents. Ces réactifs doivent donc être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés avec les précautions appliquées pour les autres échantillons de sérum ou de plasma au Biosafety Level 2 et selon les dispositions du Manuel sanitaire

6. PREPARATION ET RECOLTE DES ECHANTILLONS

Prélever les échantillons à température ambiante. **Ne pas réfrigérer les éprouvettes contenant de l'EDTA (2 mg/ml d'EDTA-Na₂ par ml de sang) utilisées pour le recueillement des échantillons de plasma. Ne pas les disposer dans un bain de glace.** Centrifuger les éprouvettes dans une centrifugeuse **non réfrigérée**, séparer immédiatement le plasma de la partie corpusculée, puis fractionner et congeler immédiatement. Ne pas réfrigérer. La cryoactivation, c'est-à-dire le processus de conversion de la pro-rénine en rénine, est obtenue lorsque les échantillons sont maintenus assez longtemps dans un bain de glace ou à une température $\leq 6^{\circ}\text{C}$. Le phénomène est provoqué dans les cas où les échantillons restent à l'état liquide, même s'ils sont disposés dans un congélateur (ils ne se congèlent pas). Avant leur dosage, les échantillons doivent être décongelés rapidement et portés à température ambiante en les disposant dans un bain d'eau tiède. Les patients auxquels des diurétiques, des anti-hypertensifs, des vasodilatateurs, des contraceptifs oraux ou de la réglisse sont administrés, devraient interrompre l'utilisation de ces substances 2 à 4 semaines avant le test. Il a été remarqué que la rénine tend à augmenter au cours de la grossesse et dans les régimes à faible apport de sodium. De plus, la rénine étant influencée par la position du corps, elle est sujette à des variations au cours de la journée. Les échantillons doivent être prélevés le matin, et la position du patient (debout ou assis) doit être notée. Les éventuelles dilutions des échantillons doivent être effectuées après la génération de l'angiotensine I à l'aide de l'étalon «0» fourni dans le kit.

Avertissements:

1. Ne pas utiliser d'héparine comme anti-coagulant, car elle influerait sur la génération d'angiotensine I.
2. Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés.

7. PROCEDURE

1. Matériel fourni

Le kit Renin (code R-EX-125) est suffisant pour 125 tubes. Il contient les réactifs suivants:

Réactif	Quantité
Renin Antisérum	1 flacon
Renin Calibrateurs	8 flacons
Renin Traceur	1 flacon
Renin Réactif de séparation	1 flacon
Renin Tampon de génération pH 6.0	1 flacon
Renin Inhibiteur enzymatique	1 flacon

2. Réactifs non fournis dans le kit (disponibles uniquement sur demande): Renin Generation Buffer pH 7,4 - Code: R-EX-LC.

3. Matériel nécessaire non fourni dans le kit

- Eau distillée;
- Eprouvettes de plastique (1 x 7 cm environ);
- Pipettes à pointes interchangeables de 0,01 - 0,1 ml;
- Bain-marie à 37°C;
- Vortex;
- Bain de glace;
- Pipettes graduées;
- Réfrigérateur à 4°C pour l'incubation;
- Permanent rack: support pour 50 tubes à essais, indispensable pour l'insertion dans le plateau aimanté;
- Magnetic Separator: support aimanté pour la séparation B/F;
- Compteur à rayons gamma.

4. Description du dosage

4.1. Génération d'angiotensine I

Pour la génération d'angiotensine I, l'utilisateur peut choisir deux pH de génération différents (pH 6,0 et pH 7,4). Le tampon pH7,4 Generation Buffer (solution orange) est disponible sur demande et le tampon pH 6,0 Generation Buffer (solution jaune) est fourni dans le kit.

Dans les deux cas, la génération d'angiotensine I est effectuée de la manière suivante:

- Dans les éprouvettes de génération en plastique disposées dans un bain de glace, additionner en suivant rigoureusement l'ordre indiqué:
- 1,0 ml d'échantillon;
- 0,01 ml d'inhibiteur enzymatique (PMSF);
- 0,1 ml de tampon de génération;
- Mélanger soigneusement à l'aide du vortex.

Pour chaque échantillon à doser, préparer 4 éprouvettes dans deux racks:

- 2 éprouvettes pour l'incubation à 37°C (marquées 37);
- 2 éprouvettes pour l'incubation en bain de glace (marquées 4).

Ces éprouvettes seront ensuite utilisées pour le dosage radioimmunologique.

- Dispenser 0,1 ml de chaque échantillon traité avec l'inhibiteur dans chacune des éprouvettes. Placer la série d'éprouvettes marquées 4 dans un bain de glace et celles de la série 37 au bain-marie à 37°C. L'incubation sera de 3 heures si l'on a travaillé avec le tampon de génération à pH 7,4 et de 90 minutes si l'on a utilisé le tampon à pH 6,0.
- % C.V. Au terme de l'incubation, mettre la série d'éprouvettes incubées à 37°C dans le bain de glace qui contenait déjà les éprouvettes de la série 4.

Procéder alors au dosage radioimmunologique.

4.2. Description du dosage radioimmunologique

Placer dans le bain de glace les groupes d'éprouvettes suivantes, avec les éprouvettes des deux séries («37» et «4») d'échantillons:

- 2 éprouvettes pour la radioactivité totale;
- 2 éprouvettes pour chaque «NSB» ;
- 2 éprouvettes pour chaque B0;
- 2 éprouvettes pour chaque concentration étalon;
- pipeter 0,1 ml d'étalon «0» dans les éprouvettes définies comme B0;
- pipeter 0,2 ml d'étalon «0» dans les éprouvettes définies comme NSB;
- pipeter 0,1 ml de chaque étalon dans les éprouvettes marquées ;
- ajouter à toutes les éprouvettes (étalons, échantillons, B0, NSB, radioactivité totale) 0,1 ml de traceur Renin ;
- ajouter à toutes les éprouvettes (sauf NSB et radioactivité totale) 0,1 ml d'antisérum Renin ;
- mélanger sur le vortex et incuber pendant 18 à 20 heures dans le bain de glace placé au réfrigérateur à 4°C;
- au terme de l'incubation, retirer le bain de glace du réfrigérateur et ajouter à toutes les éprouvettes, à l'exception de la radioactivité totale, 1,0 ml de réactif de séparation Renin en les gardant toujours dans le bain de glace. Agiter tout le support sur le vortex.
- Pour garantir l'uniformité de la dispensation, agiter de temps en temps le flacon. Attention : ne pas utiliser d'agitateur magnétiques pour homogénéiser la suspension. Retirer le support du bain de glace et incuber pendant 10 minutes à température ambiante.
- Retirer les éprouvettes identifiées comme radioactivité totale et insérer le Rack dans le Magnetic Separator en veillant à ce que le fond des éprouvettes soit en contact avec la surface du Magnetic Separator. Laisser sédimenter la suspension pendant 10 minutes.
- Eliminer soigneusement le surnageant par inversion du Magnetic Separator; poser ensuite le Magnetic Separator renversé sur un papier absorbant pour éliminer toute trace de liquide des éprouvettes.
- Compter toutes les éprouvettes (y compris celles à radioactivité totale) dans le compteur à rayons gamma pendant au moins 1 minute.

4.3. Schéma du procédé de dosage (Les volumes sont exprimés en ml)

Tubes	Echantillon "4"-"37"	B0	Etalons	NSB	Radioactivité Totale
Réactifs					
Echantillons	0,1 0,1	0,1	-	-	-
Etalon «0»	-	-	0,1	0,2	-
Etalons	-	-	-	-	-
Traceur	0,1 0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Antisérum	0,1 0,1	0,1	0,1	-	-
Agiter sur le vortex et incubé pendant 18 à 20 heures dans le bain de glace placé à 4°C au réfrigérateur. Au terme de l'incubation, retirer le bain de glace avec les éprouvettes du réfrigérateur.					
Réactif de séparation	1,0 1,0	1,0	1,0	1,0	-
Agiter le support sur le vortex et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Insérer le Rack dans le Magnetic Separator après avoir retiré les éprouvettes de radioactivité totale. Laisser sédimenter la suspension pendant 10 minutes. Décanter les éprouvettes par inversion des Magnetic Separator. Placer le Magnetic Separator enversé sur du papier absorbant pour éliminer toute trace de liquide des éprouvettes. Compter les éprouvettes, y compris celles à radioactivité totale, pendant au moins 1 minute dans le compteur à rayons gamma					

8. CALCUL DES RÉSULTATS

Nous suggérons de soustraire la moyenne des cpm de NSB à tous les comptes, sauf à la radioactivité totale. La moyenne des cpm liés dans les B0 est utilisée pour calculer le pourcentage de liaison en l'absence d'antigène froid (capacité de liaison maximum).

$$\frac{\text{Moyenne des cpm liés dans les B0} \times 100}{\text{Radioactivité totale}} = \% \text{ de liaison}$$

Calculer le pourcentage d'inhibition de chaque étalon et échantillon selon la formule suivante:

$$\frac{\text{Moyenne des cpm liés (étalons et échantillons)} \times 100}{\text{Moyenne des cpm liés dans les B0}} = \% \text{ d'inhibition}$$

Dessiner la courbe standard en posant les pourcentages d'inhibition obtenus pour chaque dose d'étalon contre les concentrations d'étalon respectives. Nous suggérons d'utiliser du papier semi-logarithmique. Reporter les doses sur les abscisses (échelle logarithmique) et les pourcentages d'inhibition sur les ordonnées (échelle linéaire). En interpolant sur la courbe les pourcentages d'inhibition, on obtient les concentrations correspondantes d'antigène en ng/ml. Pour obtenir la quantité d'angiotensine I générée, soustraire la valeur de l'échantillon correspondant gardé dans le bain de glace à la valeur de chaque échantillon incubé à 37°C. L'activité rénine plasmatique (PRA) est calculée comme ng d'angiotensine I libérée par ml de plasma par heure.

$$\text{PRA} = \frac{(\text{ng/ml "37"} - \text{ng/ml "4"}) \times 1,11^*}{\text{Heures}^{**}} \text{ ng/ml/h}$$

*1.11 = Représente le facteur de dilution que l'échantillon a subi après l'adjonction du PMSF du tampon de génération.

**Heures = Temps d'incubation pour la génération d'angiotensine I.

Pour les méthodes de calcul par ordinateur, il est conseillé de consulter la bibliographie (11,12). D'après les caractéristiques des dosages, l'utilisateur pourra choisir la méthode de calcul et l'expression graphique permettant d'obtenir le traitement des résultats le plus approprié.

1. Exemple de calcul - Courbe typique standard

Description	Moyenne cpm	B/T (%)	B/BO (%)	Dose (ng/ml)
Total radioactivity	26114	-	-	-
NSB	274	1,05	-	-
B0	21217	81,25	-	-
St. 0,2 ng/ml	18458	-	86,8	-
St. 0,50 ng/ml	15002	-	70,3	-
St. 1,0 ng/ml	10906	-	50,8	-
St. 2,0 ng/ml	7060	-	32,4	-
St. 5,0 ng/ml	3551	-	15,6	-
St. 10,0 ng/ml	2077	-	8,6	-
St. 25,0 ng/ml	1064	-	3,8	-
Echantillon 1 ("4")	17053	-	80,12	0,31
Echantillon 1 ("37")	2103	-	8,73	9,84

$$\text{Echantillon 1} = \frac{(9,84 - 0,31) \times 1,11}{1,5} = 7,05 \text{ ng/ml/heure}$$

Les données de l'exemple ne doivent en aucun cas être utilisées pour remplacer les données générées au moment du dosage par l'utilisateur.

CONTROLE QUALITE INTERNE

- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en double des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

9. LIMITES DU DOSAGE

1. Pour un bon dosage, il est nécessaire de se tenir strictement aux instructions fournies ici.
2. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption reportée sur l'étiquette des flacons.
3. Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
4. Après la reconstitution et la conservation à 4°C, les réactifs doivent être utilisés une seule fois.
Pour les périodes de plus de trois jours, congeler les réactifs à -20°C. Après la congélation, laisser les réactifs atteindre graduellement la température ambiante, en évitant l'utilisation de bain-maris à 37°C. Eviter de décongeler les réactifs plus d'une fois. Fractionner au besoin.
5. Les échantillons contaminés par la radioactivité exogène peuvent fournir des résultats peu précis.
6. La génération d'angiotensine I étant une fonction linéaire dans le temps, pour les échantillons supposés à faibles activité rénine (inférieure à 0,15 ng/ml/heure) il est possible de prolonger le temps de génération pour augmenter la sensibilité de la méthode (voir les courbes de génération du paragraphe 4). De cette manière, il est possible de reporter sur la courbe standard une valeur qui sinon se trouverait en-dehors de la courbe.
7. L'activité rénine plasmatique est strictement liée à l'apport en sodium du patient. Il est donc nécessaire d'accompagner la valeur de l'activité rénine à l'excrétion sodique quotidienne pour pouvoir obtenir un cadre clinique significatif.

10. INTERPRETATION DES RÉSULTATS

Échantillon	Activité rénine plasmatique ng/ml/heure	
	pH 6,0	pH 7,4
Position debout	0,98 - 4,18	0,15 - 2,12
Position décubitus	0,51 - 2,64	0,12 - 1,59

La marge a été calculée sur des patients qui présentent une excrétion de sodium urinaire d'environ 100 mEq/24 heures. Il est recommandé à chaque laboratoire de déterminer sa plage de normalité.

11. PERFORMANCES

1. Précision

Le test de récupération a été effectué en additionnant des quantités connues d'angiotensine à un ensemble d'échantillons de sérum. Le taux d'angiotensine I était déterminé avant et après l'addition. Le pourcentage de récupération de l'angiotensine I ajoutée était calculé.

Echantillon	Angiotensin I Ajourée (ng/ml)	Angiotensinel Mesurée (ng/ml)	% de Récupération
1	0	1,4	-
	10	10,29	88,9
	5	6,17	95,3
	2	3,45	102,3
	1	2,43	103,0
	0,5	1,94	107,0
2	0	1,97	-
	10	12,22	102,5
	5	6,42	89,0
	2	3,85	94,3
	1	2,97	100,7
	0,5	2,46	98,8
3	0	3,21	-
	10	13,90	106,9
	5	8,25	100,8
	2	5,37	108,0
	1	4,30	109,0
	0,5	3,67	92,0

2. Dilution

Le test de parallélisme a été effectué en diluant certains échantillons avec l'étalon zéro. La dilution doit être effectuée après la génération de l'angiotensine. Le pourcentage de récupération déterminé pour chaque facteur de dilution est reporté dans le tableau suivant:

Echantillon	Facteur de Dilution	Angiotensin I Mesurée (ng/ml)	% de Récupération
1	-	14,51	-
	2	7,38	101,7
	4	3,92	108,1
	8	1,83	101,1
	16	0,83	91,7
	32	0,39	85,6
2	-	19,74	-
	2	9,77	99,0
	4	5,11	103,5
	8	2,48	100,5
	16	1,15	93,2
	32	0,6	97,3
3	-	20,18	-
	2	9,66	95,7
	4	5,05	100,1
	8	2,51	99,5
	16	1,14	90,1
	32	0,62	97,7

3. Précision

Le coefficient de variation (C.V.) intra-essai a été évalué sur un ensemble de sérums mesurés 20 fois dans le même dosage. La variabilité inter-essai est indiquée dans le tableau suivant:

Echantillon	Moyenne (ng/ml)	D.S. (ng/ml)	C.V. %
1	2,86	0,15	5,1
2	4,66	0,28	6,04
3	6,41	0,22	3,39

Le coefficient de variation inter-essai (C.V.) a été évalué sur différentes concentrations le long de la courbe standard en 10 dosages différents. La variabilité inter-essai est indiquée dans le tableau suivant:

Echantillon	Moyenne (ng/ml)	D.S. (ng/ml)	C.V. %
1	2,96	0,15	5,15
2	4,61	0,19	4,18
3	6,33	0,24	3,82

4. Sensibilité

La limite de détection du dosage de Renin définie comme la concentration d'angiotensine I équivalente à la moyenne des cpm de 20 répliqués de l'étalon zéro moins deux déviations standard est de 0,033 ng/ml.

5. Spécificité

La spécificité du dosage a été évaluée en mesurant la réponse apparente du dosage à des analytes potentiellement interférents. Le pourcentage d'interférence a été calculé d'après Abraham ($x/y \times 100$) où x et y sont respectivement le poids de l'angiotensine I et de l'interférence qui causent une diminution de 50% de la capacité liante.

Réactif Croisé	Réaction Croisée
Angiotensin I	100.00 %
Angiotensin II	0.0023 %
Angiotensin III	0.02 %
Angiotensin Fragment 1-13	0.32 %
Angiotensin II Pentapeptide	0.015 %

ITALIANO

SOLO PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

R-EX-125 125 Determinazione

1. USO DEL PRODOTTO

Il kit consente la determinazione, mediante tecnica radioimmunologica, dell'attività reninica plasmatica in campioni di plasma umano (EDTA).

2. SIGNIFICATO DEL DOSAGGIO

Il sistema renina-angiotensina-aldosterone rappresenta un sistema ormonale «a cascata» di cui il primo elemento è l'angiotensinogeno. Su di esso agisce l'ormone proteolitico renina determinando la conversione dell'angiotensinogeno in angiotensina I, un polipeptide di per sé privo di azione biologica. L'angiotensina I è il substrato su cui agisce l'enzima di conversione che determina la produzione di angiotensina II biologicamente attiva. Le azioni biologiche di questo polipeptide consistono nella vasocostrizione, nella regolazione della sintesi e secrezione di aldosterone a sua volta coinvolto nell'equilibrio elettrolitico.

Questo sistema è quindi in grado di modulare la pressione arteriosa con vari meccanismi. Dal punto di vista analitico la misurazione dell'attività di questo sistema è possibile mediante la valutazione dell'attività reninica plasmatica, in quanto sia il dosaggio dell'angiotensina II che il dosaggio della concentrazione reninica incontrano problemi di ordine metodologico (concentrazioni molto basse per la prima, presenza di enzimi chimicamente simili per la seconda). La renina viene prodotta dall'apparato iuxta-glomerulare del rene e presenta un peso molecolare di circa 40.000 Dalton. La misurazione della sua attività è di importante aiuto per determinare la prognosi e la terapia di soggetti con ipertensione arteriosa. Tuttavia per una corretta valutazione dell'attività reninica plasmatica è necessario conoscere alcuni fattori che possono modulare il valore quali: l'apporto sodico, lo stato posturale e farmaci somministrati. I valori dell'attività reninica aumentano con il diminuire dell'apporto sodico, e si riducono nel passaggio dalla posizione eretta a quella supina. Inoltre alcuni tipi di farmaci quali i diuretici o i contraccettivi possono innalzare l'attività reninica plasmatica, mentre altri quali L-Dopa o Reserpina possono diminuire i valori dell'attività reninica.

Un aumento dell'attività reninica plasmatica può essere dovuto alle seguenti situazioni:

- iperreninismo con ipertensione arteriosa: ipertensione renovascolare, tumore di Wilms, sindrome di Robertson-Kihara.
- iperreninismo senza ipertensione arteriosa; carenza di sodio, sindrome nefrosica, sindrome di Bartter.

Una diminuzione dell'attività reninica plasmatica può essere dovuta alle seguenti situazioni:

- iporeninismo con ipertensione arteriosa: morbo di Conn, pseudoiperaldosteronismo primario, sindrome di Biglieri, alcuni casi di ipertensione arteriosa essenziale.
- iporeninismo senza ipertensione arteriosa: ipoaldosteronismo, ritenzione idro-salina, ridotta attività del sistema nervoso simpatico.

In alcuni casi può essere utile valutare i cambiamenti dell'attività reninica plasmatica dopo stimolazione. Uno dei test più utilizzati è la stimolazione con furosemide.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo consente di determinare l'attività reninica plasmatica, mediante il dosaggio radioimmunologico della angiotensina I. E' necessario far precedere il dosaggio radioimmunologico da una incubazione del plasma in modo tale che la renina, in condizioni standardizzate, generi angiotensina I. La presenza di inibitori enzimatici durante questa fase evita la degradazione enzimatica della angiotensina stessa. La metodica offre all'utilizzatore l'opportunità di scegliere il pH di generazione dell'angiotensina I. Il kit fornisce la possibilità di eseguire la generazione dei campioni di plasma a pH 6.0, utilizzando il tampone fornito con il kit, oppure a pH 7.4, con il tampone disponibile solo su richiesta. La generazione a pH 7.4 è simile al procedimento che si verifica nella fisiologia già umana, bloccando l'eventuale attività di altri enzimi proteolitici presenti nel plasma. La generazione a pH 6.0 produce una quantità di angiotensina doppia rispetto a quella ottenuta a pH 7.4, rendendo quindi il metodo più

sensibile soprattutto per campioni a bassa attività reninica. La generazione è una funzione lineare nel tempo, per cui si ottengono risultati costanti variando i tempi di generazione. Tuttavia per poter standardizzare la procedura, garantendo una buona ripetibilità, la metodica prevede di incubare per 90 minuti a 37°C se si lavora a pH 6.0 o per 3 ore a 37°C se si lavora a pH 7.4. Dopo la fase di generazione si procede al dosaggio radioimmunologico. L'antigene presente negli standards e nei campioni compete con il tracciante radioattivo (I^{125} - Angiotensin) per i siti di legame dell'anticorpo. Dopo opportuna incubazione, la quantità di tracciante che si lega all'anticorpo è inversamente proporzionale alla quantità di antigene presente negli standards e nei campioni. La separazione B/F viene eseguita mediante aggiunta di doppio anticorpo insolubilizzato su particelle magnetiche. L'applicazione di un campo magnetico consente la sedimentazione dell'immunocomplesso formatosi, evitando così la centrifugazione.

Le principali fasi del dosaggio RIA sono:

- Incubazione della miscela di reazione per 18-20 ore a 4°C.
- Separazione dell'immunocomplesso mediante aggiunta del doppio anticorpo insolubilizzato su particelle magnetiche.
- Decantazione del surnatante.
- Conteggio della radioattività in Gamma-counter.

4. REAGENTI - Preparazione e Conservazione

Non utilizzare reagenti di lotti differenti. I numeri dei lotti dei reagenti debbono corrispondere a quelli dichiarati sul "Certificato di Analisi". Non usare il kit oltre la data di scadenza.

Il kit Renin contiene reagenti sufficienti per 125 Tubi. Al ricevimento conservare il kit a 2...8°C sino alla data di scadenza indicata sull'etichetta dei kit.

- 1 flacone di Renin Tracciante (Rosso):** 1 flacone: Contenente Angiotensina I marcata con I^{125} , in tampone fosfato con albumina bovina e Sodio azide (0.05%). 13.0 ml per flacone. Radioattività max.: 85 kBq. La data di scadenza è riportata sull'etichetta del flacone. Il reagente è pronto per l'uso. Conservare a 2-8°C.
- 8 flaconi di Renin Calibratori:** Contenenti, in forma liofila, rispettivamente: 0- 0.2- 0.5- 1.0- 2.0- 5, 10.0- 25.0 ng/ml di Angiotensina I in tampone fosfato con albumina bovina e Sodio azide (<0.2%). La data di scadenza è riportata sull'etichetta dei flaconi. Ricostituire il contenuto del flacone Standard "0" con 2 ml di acqua distillata e i rimanenti standards con 1 ml di acqua distillata. Mescolare delicatamente fino a completa solubilizzazione del liofilo. Conservare a 2-8°C per 1 giorno o a -20°C per periodi più lunghi.
- 1 flacone di Renin Antiserum (verde):** Contenente, in forma liofila, antisiero anti-Angiotensina (ottenuto in coniglio) in tampone fosfato con gammaglobuline di coniglio, albumina bovina e Sodio Azide (0.05%). La data di scadenza è riportata sull'etichetta del flacone. Ricostituire il contenuto del flacone con 12.5 ml di acqua distillata e mescolare delicatamente fino a completa solubilizzazione del liofilo. Conservare a 2-8°C per 3 giorni o a -20°C per periodi più lunghi.
- 1 flacone di Renin Reattivo di Separazione:** Contenente antisiero anti-gammaglobuline di coniglio (ottenuto in capra) insolubilizzato su particelle magnetizzabili in tampone Tris con albumina bovina e Sodio azide (<0.1 % p/p). 125 ml. La data di scadenza è riportata sulla etichetta del flacone. La sospensione è pronta per l'uso. Conservare a 2...8°C. Non congelare.
- 1 flacone di Renin Inibitore Enzimatico:** Contenente fenilmetilsulfonil fluoruro in etanolo. 0.5 ml. Attenzione: evitare di tenere aperto il flacone oltre il tempo di utilizzo. La soluzione è pronta per l'uso. Conservare a 2-8°C. Se la soluzione tende a cristallizzare, dopo la conservazione a 4°C, è consigliabile portarla a 37°C per qualche minuto, nel flacone con tappo.
- 1 flacone di Renin Tampone di Generazione pH 6.0:** Contenente tampone fosfato. 6.0 ml. La data di scadenza è riportata sulla etichetta del flacone. La soluzione è pronta per l'uso. Conservare a 2-8°C. Non congelare.

7. **1 flacone di Renin Tampone di Generazione pH 7.4 (disponibile solo su richiesta):** Contenente tampone fosfato. 3 ml. La data di scadenza è riportata sull'etichetta del flacone. La soluzione è pronta per l'uso. Conservare a 2-8°C. Non congelare.

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI D'USO

Questo materiale è solo per uso diagnostico *in vitro*.

Il kit è per solo uso professionale, deve quindi essere usato esclusivamente da personale esperto di laboratorio, in conformità alle norme GLP.

Caratteristica fisica¹²⁵: vedere alla fine della metodica

1. **Precauzioni: Materiale Radioattivo- Non per somministrazione interna od esterna ad esseri umani o animali.**

Il materiale radioattivo può essere acquistato, ordinato e detenuto solo da personale medico, laboratori di analisi, ospedali ed unicamente per uso diagnostico IN VITRO, non per somministrazione interna od esterna in esseri umani o animali. Il ricevimento, l'acquisto, il possesso, l'uso e il trasferimento di tale materiale è soggetto a regolamentazioni che possono differire da Nazione a Nazione.

Misure precauzionali nell'utilizzo di materiale radioattivo:

- o Conservare il materiale radioattivo in apposite aree.
- o Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree destinate all'uso di materiali radioattivi.
- o Non pipettare la soluzione radioattiva con la bocca.
- o Indossare guanti durante l'utilizzo di materiale radioattivo e lavare accuratamente le mani dopo l'impiego di tale materiale.
- o Coprire l'area di lavoro con carta assorbente a perdere.
- o Ogni perdita accidentale di radioattivo deve essere trattata in accordo con le procedure stabilite.
- o Tutti i materiali radioattivi vanno eliminati in appositi sistemi di smaltimento secondo le disposizioni emesse dagli organi di controllo con giurisdizione sul laboratorio.

2. **Rischio Chimico - Sodio Azide (NaN₃):** La Sodio Azide è impiegata nei reagenti del kit ad una concentrazione finale non superiore a 0.2% p/p. La Sodio azide può reagire con tubature di scarico in piombo e rame formando azidi metalliche altamente esplosive. Quando si procede all'eliminazione del prodotto sciagquare abbondantemente con acqua per evitare l'accumulo di azidi. La Sodio azide è un veleno che può essere fatale se ingerito. Non pipettare il materiale contenente Sodio azide con la bocca. Maneggiare con cura evitando il contatto con la pelle e lavare le mani dopo aver lavorato con materiale contenente Sodio azide.

Frasi di rischio

R-21/22 Dannoso a contatto con la pelle e se ingerito

Frasi di sicurezza

S-26 In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con tanta acqua e consultare un medico.

S-28.1 Dopo il contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con tanta acqua.

S-46 Se ingerito consultare subito un medico, mostrandogli il contenitore o l'etichetta.

3. **Rischio Biologico - Siero Umano:** Il kit contiene alcuni reagenti preparati con siero o plasma umano. Il siero e il plasma impiegati sono stati testati con un metodo approvato dalla FDA e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi HIV-1/2, HCV e HBsAg. In ogni caso, poiché nessun metodo offre completa assicurazione che HIV-1/2, HCV, HBsAg o altri agenti infettivi siano assenti, questi reagenti devono essere considerati potenzialmente infettivi e maneggiati con le stesse precauzioni adottate per altri campioni di siero o di plasma al Biosafety Level 2 e secondo le disposizioni del manuale sanitario CDC (Centers for Disease Control/National Institutes of Health), "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3rd Edizione, 1993.

6. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Prelevare i campioni a temperatura ambiente. **Non refrigerare le provette, contenenti l'EDTA (2 mg/ml di EDTA-Na₂ per ml sangue), utilizzate per la raccolta dei campioni di plasma, né porle in bagno di ghiaccio.** Centrifugare le provette in una centrifuga **non refrigerata**, separare immediatamente il plasma dalla parte corpuscolata, quindi aliquotare e congelare immediatamente. Non refrigerare. La

crioattivazione, che è il processo di conversione della Pro-Renina a Renina, si ha quando i campioni sono mantenuti, per un periodo di tempo sufficientemente lungo, in bagno di ghiaccio o a temperatura ≤ 6°C, il fenomeno si innesca, inoltre, anche nel caso in cui campioni, pur se posti in congelatore, rimangono allo stato liquido (i.e. Non congelano). Prima del loro dosaggio i campioni devono essere scongelati rapidamente e portati a temperatura ambiente ponendoli in bagno di acqua tiepida. Pazienti che assumono diuretici, anti-ipertensivi, vasodilatatori, contraccettivi orali e liquirizia, dovrebbero interrompere l'uso di queste sostanze dalle 2 alle 4 settimane prima del test. Si è notato che la Renina tende ad aumentare in gravidanza e nelle diete con ridotto apporto di sodio. Inoltre, poiché la Renina è influenzata dalla posizione del corpo ed è soggetta a variazione durante la giornata, i campioni devono essere prelevati di mattina, e deve essere annotata la posizione del paziente (seduto od in piedi). Eventuali diluizioni dei campioni devono essere eseguite dopo la generazione dell'Angiotensina I, usando lo standard "0" fornito con il kit.

Avvertenze:

1. Non è possibile utilizzare eparina come anticoagulante in quanto interferirebbe nella generazione di Angiotensina I.
2. Non è possibile utilizzare campioni emolizzati.

7. PROCEDURA

1. Materiali forniti

Il kit Renin (codice R-EX-125), sufficiente per 125 tubi, contiene i seguenti reagenti:

Reagente	Quantità
Renin Antisiero	1 Flacone
Renin Calibratori	8 Flaconi
Renin Tracciante	1 Flacone
Renin Reattivo di Separazione	1 Flacone
Renin Tampone di Generazione pH 6.0	1 Flacone
Renin Inibitore Enzimatico	1 Flacone

2. **Reagenti Non Forniti con il Kit (disponibili solo su richiesta):**

Renin Generation Buffer pH 7.4 - Codice: R-EX-LC.

3. **Materiali Necessari ma non Forniti con il Kit**

- Acqua distillata;
- Provette in plastica (circa 1 x 7 cm);
- Pipette a punte intercambiabili da 0.01 - 0.1 ml;
- Bagnomaria a 37°C;
- Vortex;
- Bagno di ghiaccio;
- Pipette graduate;
- Frigorifero a 4°C per l'incubazione;
- Permanent rack: porta provette in plastica da 50 posti indispensabile per l'inserimento nel vassoio con calamita.
- Magnetic Separator: supporto con calamita per la separazione B/F.
- Gamma-counter

4. **Descrizione del Dosaggio**

4.1. Generazione di Angiotensin I

Per la generazione di Angiotensina I l'utilizzatore può a sua discrezione scegliere tra due differenti pH di Generazione (pH 6.0 e pH 7.4) utilizzando il tampone pH 7.4 Geneartion Buffer (soluzione arancione) disponibile solo su richiesta o il tampone pH 6.0 Geneartion Buffer (soluzione gialla) fornito con il kit.

In entrambi i casi la generazione di Angiotensina I viene eseguita nel modo seguente:

- Nelle provette di generazione in plastica, poste in bagno di ghiaccio, aggiungere seguendo rigorosamente l'ordine indicato:
- 1.0 ml di campione;
- 0.01 ml di Inibitore Enzimatico (PMSF);
- 0.1 ml di Tampone di Generazione;
- Mescolare accuratamente mediante vortex;

Preparare per ogni campione da dosare 4 provette e inserirle in due Rack:

- 2 provette per l'incubazione a 37°C (siglate con 37);
- 2 provette per l'incubazione in bagno di ghiaccio (siglate con 4).

Queste provette saranno poi utilizzate per il dosaggio radioimmunologico.

- In ciascuna provetta dispensare 0.1 ml di ciascun campione trattato con l'inibitore. Porre la serie di provette siglate con 4 in bagno di ghiaccio e quelle della serie 37 in bagnomaria a 37°C. L'incubazione sarà di 3 ore se si è lavorato con il buffer di generazione a pH 7.4; di 90 minuti se il buffer usato è per la generazione a pH 6.0.
- Al termine dell'incubazione portare la serie di provette incubate a 37°C nel bagno di ghiaccio, nel quale erano già contenute le provette della serie 4.

A questo punto si procede al dosaggio radioimmunologico.

4.2. Descrizione del Dosaggio Radioimmunologico

Porre nel bagno di ghiaccio e unitamente alle provette delle due serie ("37" e "4") di campioni, i seguenti gruppi di provette:

- 2 provette per radioattività totale;
- 2 provette per NSB;
- 2 provette per B0;
- 2 provette per ogni concentrazione standard;
- pipettare 0.1 ml di standard "0" nelle provette definite B0;
- pipettare 0.2 ml di standard "0" nelle provette definite NSB;
- pipettare 0.1 ml di ogni standard nelle provette opportunamente siglate;
- aggiungere a tutte le provette (standards, campioni, B0, NSB, Radioattività Totale) 0.1 ml di Renin Tracer;
- aggiungere a tutte le provette (tranne NSB e Radioattività Totale) 0.1 ml di Renin Antiserum;
- miscelare su vortex ed incubare per 18-20 ore nel bagno di ghiaccio posto a 4°C in frigorifero;
- al termine dell'incubazione, rimuovere il bagno di ghiaccio dal frigorifero e sempre mantenendo le provette in bagno di ghiaccio aggiungere a tutte le provette, eccetto che alla radioattività totale, 1.0 ml di Renin Separation Reagent e agitare su vortex l'intero rack.

Per garantire uniformità di dispensazione agitare di tanto in tanto il flacone. Attenzione: non usare agitatori magnetici per omogeneizzare la sospensione. Rimuovere il rack dal bagno di ghiaccio e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente.

Togliere dal Rack le provette radioattività totale e inserire il Rack nel Magnetic Separator, assicurandosi che il fondo delle provette sia a contatto con la superficie del Magnetic Separator. Lasciare che la sospensione sedimenti per 10 minuti.

- Eliminare accuratamente il sovrantante per inversione del Magnetic Separator, ponendo poi il Magnetic Separator capovolto su una superficie di carta assorbente per eliminare ogni traccia di liquido dalle provette.
- Contare tutte le provette (incluse quelle della radioattività totale) in Gamma-counter per almeno 1 minuto.

4.3. Schema di Procedimento del Dosaggio (I volumi sono espressi in ml)

Reattivi	Tubi	Campione "4"- "37"	B0	Standard	NSB	Radioattività Totale
Campioni	0,1 0,1	0,1	-	-	-	-
Standard "0"	-	-	0,1	0,2	-	-
Standards	-	-	-	-	-	-
Tracer	0,1 0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Antiserum	0,1 0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
Agitare su vortex ed incubare per 18-20 ore in bagno di ghiaccio posto a 4°C in frigorifero. Al termine dell'incubazione, rimuovere il bagno di ghiaccio con le provette dal frigorifero.						
Separation Reagent	1,0 1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-
Agitare il rack su vortex ed incubare per 10 minuti a temperatura ambiente. Inserire il Rack nel Magnetic Separator dopo aver tolto le provette della radioattività totale. Lasciare che la sospensione sedimenti per 10 minuti. Decantare le provette mediante inversione del Magnetic Separator. Porre il Magnetic Separator capovolto su una superficie di carta assorbente per eliminare ogni traccia di liquido dalle provette. Contare tutti i tubi, compresi quelli della radioattività totale, per almeno 1 minuto nel Gamma-counter.						

8. CALCOLO DEI RISULTATI

Consigliamo di sottrarre a tutte le letture eccetto che a quelle della Radioattività Totale la media dei cpm di NSB. La media dei cpm legati nei B0 viene usata per calcolare la percentuale di legame in assenza di ormone freddo (potere legante massimo).

$$\frac{\text{Media cpm legati nei B0} \times 100}{\text{Radioattività Totale}} = \% \text{ di legame}$$

Calcolare la percentuale di inibizione di ogni standard e campione con la seguente formula:

$$\frac{\text{Media cpm legati (standards, campioni)} \times 100}{\text{Media cpm legati nei B0}} = \% \text{ di inibizione}$$

Disegnare la curva standard ponendo le percentuali di inibizione ottenute per ogni dose di standard, contro le varie concentrazioni di standard. Consigliamo di usare carta semilogaritmica riportando le dosi sulle ascisse (scala logaritmica) e le percentuali di inibizione sulle ordinate (scala lineare). Interpolando sul grafico della curva le percentuali di inibizione si ricavano le corrispondenti concentrazioni di antigene in ng/ml. Per ottenere la quantità di angiotensina I generata, sottrarre il valore del corrispondente campione tenuto in bagno di ghiaccio al valore di ogni campione incubato a 37°C. L'attività reninica plasmatica (PRA) è calcolata come ng di angiotensina I liberati per ml di plasma per ora.

$$\text{PRA} = \frac{(\text{ng/ml "37"} - \text{ng/ml "4"}) \times 1.11^*}{\text{Ore}^{**}} \text{ ng/ml/h}$$

*1.11 = Rappresenta il fattore di diluizione che ha subito il campione dopo l'aggiunta del PMSF e del Generation Buffer.

**Ore = Tempo di incubazione per la generazione di angiotensina I.

Per metodi di calcolo mediante computer consigliamo di consultare la bibliografia allegata (11,12). L'utilizzatore in base alle caratteristiche del dosaggio potrà scegliere il metodo di calcolo e l'espressione grafica che consentono di ottenere il trattamento di risultati più idoneo.

1. Esempio di calcolo - Curva Tipica Standard

Descrizione	Media cpm	B/T (%)	B/BO (%)	Dose (ng/ml)
Radioattività Totale	26114	-	-	-
NSB	274	1,05	-	-
B0	21217	81,25	-	-
St. 0,2 ng/ml	18458	-	86,8	-
St. 0,50 ng/ml	15002	-	70,3	-
St. 1,0 ng/ml	10906	-	50,8	-
St. 2,0 ng/ml	7060	-	32,4	-
St. 5,0 ng/ml	3551	-	15,6	-
St. 10,0 ng/ml	2077	-	8,6	-
St. 25,0 ng/ml	1064	-	3,8	-
Campione 1 ("4")	17053	-	80,12	0,31
Campione 1 ("37")	2103	-	8,73	9,84

$$\text{Campione 1} = \frac{(9.84 - 0.31) \times 1.11}{1.5} = 7,05 \text{ ng/ml/ora}$$

I dati dell'esempio non devono essere usati in luogo dei dati ottenuti dall'utilizzatore.

CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un'aliquota più di due volte.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

9. LIMITI DEL DOSAGGIO

- 1. È necessario, per il buon andamento del dosaggio, attenersi scrupolosamente alle istruzioni qui riportate.
- 2. Non utilizzare i reattivi oltre la data di scadenza riportata sulla etichetta dei flaconi.
- 3. Non mescolare reagenti di lotti differenti.
- 4. Dopo ricostituzione e conservazione a 4°C, i reagenti devono essere usati una sola volta.
Per periodi superiori ai tre giorni, è necessario congelare i reagenti a -20°C. Dopo il congelamento lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente gradualmente, evitando l'uso di bagnomaria a 37°C. Evitare di scongelare i reagenti più di una volta, se necessario frazionare in aliquote.
- 5. Campioni contaminati da radioattività esogena possono fornire risultati inaccurati.
- 6. Poiché la generazione di angiotensina I è una funzione lineare nel tempo, per campioni supposti a bassissima attività reninica (inferiori a 0.15 ng/ml/ora) è possibile prolungare il tempo di generazione per aumentare la sensibilità del metodo (vedere curve di generazione al paragrafo 4). In questo modo è possibile riportare sulla curva standard un valore che altrimenti sarebbe letto fuori curva.
- 7. L'attività reninica plasmatica è strettamente correlata all'apporto sodico del paziente. È quindi necessario affiancare il valore dell'attività reninica con l'escrezione sodica giornaliera per potere avere un quadro clinico significativo.

10. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Campione	Attività Reninica plasmatica ng/ml/ora	
	pH 6,0	pH 7,4
Posizione eretta	0,98 - 4,18	0,15 - 2,12
Posizione supina	0,51 - 2,64	0,12 - 1,59

Il range è stato calcolato su pazienti che presentano una escrezione di sodio urinario di circa 100 mEq/24 ore. Consigliamo che ogni laboratorio determini il proprio range di normalità.

11. PERFORMANCES

1. Accuratezza

Il test di recupero veniva eseguito aggiungendo quantità note di Angiotensina I ad un pool di campioni di plasma. I valori di Angiotensina I venivano determinati prima e dopo l'aggiunta e veniva calcolata la percentuale di recupero dell'Angiotensina I aggiunta.

Campione	Angiotensina I aggiunta (ng/ml)	Angiotensina I misurata (ng/ml)	% Recupero
1	0	1,4	-
	10	10,29	88,9
	5	6,17	95,3
	2	3,45	102,3
	1	2,43	103,0
	0,5	1,94	107,0
2	0	1,97	-
	10	12,22	102,5
	5	6,42	89,0
	2	3,85	94,3
	1	2,97	100,7
	0,5	2,46	98,8
3	0	3,21	-
	10	13,90	106,9
	5	8,25	100,8
	2	5,37	108,0
	1	4,30	109,0
	0,5	3,67	92,0

2. Diluizione

Il test di parallelismo è stato eseguito diluendo alcuni campioni con lo standard Zero. La diluizione deve essere effettuata dopo la generazione dell'angiotensina. Le percentuali di recupero determinate per ogni fattore di diluizione sono riportate nella tabella seguente:

Campione	Fattore di diluizione	Angiotensina I misurata (ng/ml)	% Recupero
1	-	14,51	-
	2	7,38	101,7
	4	3,92	108,1
	8	1,83	101,1
	16	0,83	91,7
	32	0,39	85,6
2	-	19,74	-
	2	9,77	99,0
	4	5,11	103,5
	8	2,48	100,5
	16	1,15	93,2
	32	0,6	97,3
3	-	20,18	-
	2	9,66	95,7
	4	5,05	100,1
	8	2,51	99,5
	16	1,14	90,1
	32	0,62	97,7

3. Precisione

Il coefficiente di variazione (C.V.) Intra-Assay è stato valutato su un pool di plasmi misurati 20 volte nello stesso dosaggio. La variabilità Intra-Assay è riportata nella tabella seguente:

Campione	Media (ng/ml)	D.S. (ng/ml)	C.V. %
1	2,86	0,15	5,1
2	4,66	0,28	6,04
3	6,41	0,22	3,39

Il coefficiente di variazione Inter-Assay (C.V.) è stato valutato su varie concentrazioni lungo la curva standard in 10 diversi dosaggi. La variabilità Inter-Assay è riportata sulla tabella seguente:

Campione	Media (ng/ml)	D.S. (ng/ml)	C.V. %
1	2,96	0,15	5,15
2	4,61	0,19	4,18
3	6,33	0,24	3,82

4. Sensibilità

Il limite di rilevazione del dosaggio di Renin definito come la concentrazione di Angiotensina I equivalente alla media dei cpm di 20 replicati dello Standard Zero meno due deviazioni standard è di 0.033 ng/ml.

5. Specificità

La specificità del dosaggio è stata valutata misurando la risposta apparente dei dosaggio ad analiti potenzialmente interferenti. La percentuale di interferenza è stata calcolata secondo il metodo di Abraham ($x/y \times 100$) dove x e y sono rispettivamente il peso dell'Angiotensina I e dell'interferente tali da causare un abbassamento del 50% della capacità legante.

Cross-Reagente	Cross-Reazione
Angiotensin I	100.00 %
Angiotensin II	0.0023 %
Angiotensin III	0.02 %
Angiotensin Fragment 1-13	0.32 %
Angiotensin II Pentaptide	0.015 %

1. PRZEZNACZENIE TESTU

Oznaczenie radioimmunoenzymatyczne do pomiaru aktywności reninowej osocza w osoczu ludzkim.

2. WYJAŚNIENIE ZASAD TESTU

Układ renina-angiotensyna-aldosteron jest kaskadą hormonalną, której pierwszym składnikiem jest angiotensynogen. Renina, enzym proteolityczny, przekształca angiotensynogen do angiotensyny I, która jest polipeptydem nieprzejawiającym aktywności biologicznej. Angiotensyna I jest substratem enzymu konwertującego, który wytwarza aktywną biologicznie angiotensynę II. Angiotensyna II działa głównie wazokonstrykcyjnie oraz wpływa na syntezę i uwalnianie aldosteronu - modulatora równowagi elektrolitowej. Dlatego układ renina-angiotensyna-aldosteron (RAS) reguluje ciśnienie tętnicze krwi za pośrednictwem kilku mechanizmów. Biorąc pod uwagę problemy metodologiczne związane z oznaczaniem angiotensyny I i reniny (niskie poziomy angiotensyny I oraz występowanie podobnych strukturalnie enzymów do reniny), aktywność reninowa osocza pozwala na ocenę układu RAS. Renina jest syntetyzowana w aparacie przykłębuszkowym w nerkach i charakteryzuje się masą cząsteczkową 40 000 Daltonów. Pomiar jej aktywności jest dobrą metodą oceny rokowania i leczenia pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Jednak należy pamiętać, że wartości mogą być zmieniane przez następujące czynniki: podaż sodu, pozycję stojącą lub leżącą i przyjmowanie leków. Aktywność reninowa osocza wzrasta wraz z redukcją przyjmowania sodu i maleje wraz ze zmianą pozycji ciała z leżącej na stojącą. Ponadto niektóre leki, np. diuretyki lub doustne leki antykoncepcyjne, mogą zwiększać aktywność reninową osocza, podczas gdy inne, takie jak L-Dopa i rezerpina, mogą ją obniżać.

Nadmierna aktywność reniny może występować w następujących sytuacjach:

- Nadmierna aktywność reniny z towarzyszącym nadciśnieniem tętniczym: nadciśnienie nerkopochodne, guz Wilmsa, zespół Robertson – Kihara.
- Nadmierna aktywność reniny bez towarzyszącego nadciśnienia tętniczego: niedobór sodu, zespoły nerczycowe, zespół Bartter'a.

Obniżona aktywność reniny może występować w następujących sytuacjach:

- Obniżona aktywność reniny z towarzyszącym nadciśnieniem tętniczym: Zespół Conn'a, pierwotny pseudohiperaldosteronizm, zespół Biglieri, niektóre przypadki nadciśnienia pierwotnego.
- Obniżona aktywność reniny bez towarzyszącego nadciśnienia tętniczego: hipoadosteronizm, retencja wody i sodu, obniżona aktywność układu współczulnego.

W niektórych sytuacjach może być przydatna ocena zmiany aktywności reninowej osocza, po wykonaniu testów dynamicznych. Jednym z wielu użytecznych badań jest test stymulacji furosemidem.

3. ZAŁOŻENIA METODY

Zestaw jest przeznaczony do określenia aktywności reninowej osocza za pomocą oznaczenia radioimmunoenzymatycznego angiotensyny I. Przed wykonaniem oznaczenia, osocze musi być inkubowane w taki sposób, aby renina doprowadziła do wytworzenia (generacji) angiotensyny I w wystandaryzowanych warunkach. Inhibitor enzymatyczny zapobiega degradacji enzymatycznej angiotensyny I, w trakcie etapu generacji.

Procedura pozwala na wybór pH generacji przez użytkownika.

W zestawie można przeprowadzić etap generacji w środowisku o dwóch różnych wartościach pH, stosując:

- Bufor generacyjny pH 6,0 - wykorzystując fiolkę dostarczoną wraz z zestawem odczynników.
- Bufor generacyjny pH 7,4 - wykorzystując fiolkę dostarczoną wyłącznie na zamówienie.

Generacja w środowisku pH 7,4 jest takim samym procesem, jak przebiegający w warunkach fizjologicznych u człowieka, przebiegającym z zablokowaniem aktywności innych enzymów osocza. Generacja w środowisku pH 6,0 prowadzi do wytworzenia dwukrotnej ilości substratu, w porównaniu do pH 7,4. Dlatego metoda z wykorzystaniem środowiska pH 6,0 jest bardziej wiarygodna dla próbek o niskiej aktywności reniny.

Wytwarzanie angiotensyny jest funkcją liniową w czasie, dlatego zmiana czasu generacji prowadzi do takich samych wyników. Niemniej jednak, w celu odpowiedniego wystandaryzowania metody i zagwarantowania właściwej precyzji, procedura polega na 90-minutowej inkubacji w środowisku o pH 6,0 i 3-godzinnej inkubacji w środowisku o pH 7,4. Po generacji przeprowadzane jest oznaczenie radioimmunologiczne. Antygen pochodzący ze standardów lub z próbek współzawodniczy ze znacznikiem radioaktywnym (Angiotensyną znakowaną I¹²⁵) o miejsca antygenowe na przeciwciałach. Po inkubacji, ilość znacznika związanego z przeciwciałem będzie odwrotnie proporcjonalna do ilości antygeny obecnego w standardach lub próbkach. Przez dodanie podwójnych przeciwciał związanych z cząstkami magnetycznymi przeprowadzana jest separacja B/F. Zastosowanie pola magnetycznego prowadzi do wytrącania immunokompleksów, co pozwala na pominięcie etapu wirowania.

Główne etapy oznaczenia RIA są następujące:

- inkubacja mieszaniny reakcyjnej przez 18-20 godzin w temperaturze 4°C;
- separacja B/F poprzez dodanie podwójnych przeciwciał związanych z cząstkami magnetycznymi;
- osuszenie supernatantu;
- obliczenie radioaktywności w liczniku gamma.

4. ODCZYNNIKI

Nie wolno wymieniać odczynników z różnych serii zestawów. Numery serii odczynników powinny być takie, jak przedstawiono w "Certyfikacie oznaczenia". Nie wolno używać składników, których termin przydatności do użycia minął.

Zestaw reninowy zawiera odczynniki wystarczające dla 125 probówek. Po przyjęciu zestawu należy przechowywać go w temperaturze 2-8°C do daty ważności przedstawionej na etykiecie zestawu.

1. Znacznik reninowy, 1 fiołka (czerwona):

Zawiera angiotensynę I znakowaną I¹²⁵ w buforze fosforanowym, z dodatkiem bydlęcej albuminy surowiczej i azydku sodowego 0,05%. 13,0 ml na fiolkę. Maksymalna radioaktywność: 85 kBq. Data ważności jest wydrukowana na etykietach fiolek. Odczynnik jest gotowy do zastosowania. Należy przechowywać w temperaturze 2-8°C.

2. Kalibratory reninowe, 8 fiolek:

Zawierają: 0- 0,2- 0,5- 1,0- 2,0- 5,0- 10,0- 25,0 ng/ml liofilizowanej angiotensyny I w buforze fosforanowym z bydlęcą albuminą surowiczą i azydkiem sodowym 0,2 % ilości wagowej. Data ważności jest wydrukowana na etykietach fiolek. Należy rozpuścić zawartość standardu '0' w 2 ml wody destylowanej a inne standardy w 1 ml wody destylowanej. Następnie delikatnie wymieszać, aż do całkowitego rozpuszczenia suchych i zamrożonych resztek. Przechowywać w temperaturze 2-8°C przez 1 dzień lub w -20°C przez dłuższe okresy.

3. Antysurowica reninowa (kolor zielony), 1 fiołka:

Zawiera liofilizowaną, króliczą angiotensynę I w buforze fosforanowym, wraz z króliczą gammaglobuliną, bydlęcą albuminą surowiczą i azydkiem sodowym 0,05% ilości wagowej. Data ważności jest wydrukowana na etykietach fiolek. Należy rozpuścić zawartość fiołki przy pomocy 12,5 ml wody destylowanej i delikatnie wymieszać do całkowitego rozpuszczenia suchych i zamrożonych cząstek. Przechowywać w temperaturze 2-8°C przez 3 dni lub w -20°C przez dłuższe okresy.

4. Odczynnik separacyjny reninowy, 1 fiołka:

Zawiera kozią gammaglobulinę anti-króliczą, związaną z cząstkami magnetycznymi w buforze Tris, z bydlęcą albuminą surowiczą i azydkiem sodowym <0,1% w/v .125 ml. Data ważności jest wydrukowana na etykietach fiolek. Roztwór jest gotowy do użycia. Należy przechowywać w temperaturze 2-8°C.. Nie wolno zamrażać.

5. **Bufor generacyjny reninowy pH 6,0, 1 fiołka:** Zawiera 6,0 ml buforu fosforanowego z dodatkiem żółtego barwnika. Data ważności jest wydrukowana na etykietach fiolek. Zawiesina jest gotowa do zastosowania. Należy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Nie wolno zamrażać.
6. **Bufor generacyjny reninowy pH 7,4, 1 fiołka (dostarczany na zamówienie):** Zawiera 3,0 ml buforu fosforanowego z barwnikami (pomarańczowymi). Data ważności jest wydrukowana na etykietach fiolek. Roztwór jest gotowy do użycia. Należy przechowywać w temperaturze 2-8°C. Nie wolno zamrażać.
7. **Inhibitor enzymatyczny reninowy, 1 fiołka:** Zawiera fenylometylosulfonylofluorek (PMSF) w etanolu. Przechowywać w temperaturze 2-8°C. Jeżeli roztwór przyjmie postać krystaliczną po przechowywaniu w temperaturze 4°C, należy pozostawić go w zamkniętej fiołce w temperaturze 37°C. Ostrzeżenie: Należy unikać otwierania fiołki poza stosowaniem preparatu. Roztwór jest gotowy do użycia.

5. UWAGI I OSTRZEŻENIA DLA UŻYTKOWNIKÓW

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Test może być stosowany wyłącznie przez odpowiednio wyszkolony personel laboratoryjny a postępowanie powinno być zgodne z zasadami właściwej praktyki laboratoryjnej (GLP).

Materiał radioaktywny - Nie należy stosować wewnętrznie ani zewnętrznie u ludzi i zwierząt.

Materiał radioaktywny może być przyjmowany, nabywany, posiadany i wykorzystywany wyłącznie przez lekarzy, laboratoria kliniczne lub szpitale tylko do celów badań klinicznych lub laboratoryjnych metodą *in vitro*, nie związanych z podawaniem wewnętrznym lub zewnętrznym tego materiału, lub działaniem promieniowania, w odniesieniu do ludzi i zwierząt. Przyjmowanie, nabywanie, posiadanie, wykorzystywanie i transport są związane z odpowiednimi przepisami dla każdego kraju. Charakterystyka fizyczna ¹²⁵I: szczegóły na końcu instrukcji

1. **Zasady bezpieczeństwa:** W postępowaniu z materiałami radioaktywnymi należy przestrzegać poniższych zasad:
 - o Przechowywać materiały radioaktywne w miejscach odpowiednio oznaczonych.
 - o Nie wolno spożywać napojów, pokarmów, palić tytoniu lub stosować kosmetyków w miejscach postępowania z materiałami radioaktywnymi.
 - o Nie pipetować ustami.
 - o W czasie stosowania materiałów radioaktywnych należy zakładać rękawiczki a po zastosowaniu dokładnie umyć ręce.
 - o Pokryć obszar roboczy jednorazowym papierem absorbującym.
 - o Natychmiast i dokładnie wytrzeć wszelkie plamy i utylizować materiały skażone zgodnie z zasadami dotyczącymi materiałów radioaktywnych.
 - o Utylizować płynne materiały radioaktywne do systemu kanalizacyjnego, jeżeli jest to dozwolone miejscowymi przepisami.
2. **Ostrzeżenie przed ZAGROŻENIEM CHEMICZNYM związanym z obecnością azydki sodowego (NaN₃):** Niektóre z odczynników w zestawie zawierają azydki sodowe jako środek konserwujący. W każdym z tych odczynników stężenie azydki sodowego jest poniżej 0,2%. Azydki sodowe mogą reagować z miedzią i ołowiem tworząc wybuchowe azydki metali. Wszystkie odczynniki nieradioaktywne należy utylizować w układzie kanalizacji przepływając dużą ilością wody.
Symbole możliwych zagrożeń
R 21/22 Szkodliwe w kontakcie ze skórą i po połknięciu.
Symbole bezpieczeństwa
S-26 Jeżeli dojdzie do kontaktu z oczami, należy natychmiast przemyć je dużą ilością wody i zgłosić się po pomoc lekarską.
S-28.1 Po kontakcie ze skórą należy przepłukać miejsce dużą ilością wody.
S-46 W przypadku połknięcia produktu, należy natychmiast udać się po pomoc lekarską, pokazując opakowanie lub etykietkę.
3. **Ostrzeżenie MATERIAŁ POTENCJALNIE SKAŻONY BIOLOGICZNIE:** W zestawie mogą znajdować się niektóre odczynniki wytworzone z ludzkiej surowicy lub osocza. Wykorzystane surowice lub osocza zostały przebadane za pomocą metod zaaprobowanych przez FDA i uznane jako nieaktywne jeżeli chodzi o przeciwciała HIV-1/2, HCV i HbsAg.

Ponieważ żadna z metod nie daje pełnej gwarancji, że HIV1/2, HCV, HbsAg lub inne czynniki zakaźne są nieobecne, postępowanie z takimi odczynnikami powinno być zgodne z Poziomem 2 Zasad Bezpieczeństwa Biologicznego jakie zaleca się dla próbek ludzkiej surowicy lub krwi w podręczniku Centrum Kontroli Chorób/Narodowych Instytutów Zdrowia: "Bezpieczeństwo Biologiczne w Laboratoriach Mikrobiologicznych i Biomedycznych," wydanie trzecie 1993 (Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 3rd Edition 1993).

6. POBIERANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBEK

Należy pobierać próbki w temperaturze pokojowej. **Nie wolno chłodzić próbek zawierających EDTA-Na₂ (2 mg/ml krwi) ani przechowywać próbek w lodzie.** Probówki należy wrować w wirówce niechłodzonej a po wirowaniu natychmiast oddzielać osocze od komórek, następnie podzielić materiał na mniejsze objętości i natychmiast zamrażać. Nie wolno schładzać. Jeżeli próbki są schładzane lub narażone na działanie temperatur poniżej 6°C przez dłuższy okres czasu oraz jeżeli próbki są schłodzone, ale pozostają w stanie ciekłym (tzn. nie są zamrożone), dochodzi do krioaktywacji, polegającej na konwersji proreniny do reniny. Przed oznaczeniem, próbki powinny być szybko ogrzane do temperatury pokojowej, poprzez pozostawienie ich w ciepłej wodzie. Pacjenci przyjmujący diuretyki, leki przeciwnadciśnieniowe, leki rozszerzające naczynia obwodowe, doustne środki antykoncepcyjne oraz preparaty zawierające lukrecję, powinni przerwać przyjmowanie tych substancji przez 2 - 4 tygodnie przed wykonaniem oznaczenia. Należy zauważyć, że poziom reniny jest podwyższony w ciąży i w przypadku stosowania diety z niską podażą soli kuchennej. Oprócz tego, w związku ze zmiennością dobową reniny oraz zależnością jej poziomu od pozycji ciała, próbki krwi powinny być pobierane nad ranem a pozycja pacjenta (siedząca lub leżąca) powinna zostać odnotowana. Ewentualne rozcieńczenia mogą zostać wykonane po zakończeniu etapu generacji angiotensyny I, przy pomocy standardu '0', dostarczonego w zestawie. Ostrzeżenie:

- Nie wolno stosować heparyny jako antykoagulantu, ponieważ przejawia ona interferencję w trakcie generacji angiotensyny I.
- Nie wolno wykorzystywać próbek zhemolizowanych.

7. PROCEDURA TESTU

1. Materiały zawarte w zestawie

Zestaw reninowy (R-EX-125) zawiera następujące odczynniki wystarczające dla 125 próbek:

Odczynniki	Ilość
Antysurowica reninowa	1
Standardy reninowe	8
Znacznik reninowy	1
Odczynnik separacyjny reninowy	1
Bufor generacyjny reninowy pH 6,0	1
Inhibitor enzymatyczny reninowy	1

2. Odczynniki niedostarczone w zestawie, ale dostarczane na zamówienie

Bufor generacyjny reninowy pH 7,4 - Kod R-EX-LC.

3. Materiały i wyposażenie wymagane, ale nie zawarte w zestawie

- Woda destylowana;
- Plastikowe probówki testowe (około 1 x 7 cm);
- Łaźnia wodna - 37°C;
- Pipety o różnych rozmiarach;
- Kąpiel lodowa;
- Automatyczne mikropipety z jednorazowymi końcówkami (0,01 - 0,1 ml);
- Chłodziarka 4°C;
- Wirowe;
- Stojak: na 50 próbek, jednorazowy, wsuwany do separatora magnetycznego;
- Separator magnetyczny: Płytkę magnetyczną do separacji B/F;
- Licznik gamma.

4. Procedura oznaczenia

4.1 Generacja (wytwarzanie) angiotensyny I

Użytkownik może dokonać wyboru pH generacji poprzez zastosowanie buforu generacyjnego o pH 7,4 (kolor pomarańczowy - odczynnik dostarczany wyłącznie na dodatkowe zamówienie) lub buforu o pH 6,0 (kolor żółty - odczynnik dostarczany w zestawie).

W obydwu sytuacjach należy przestrzegać poniższej procedury, dodając do próbek plastikowych substancje w następującej kolejności:

- 1,0 ml próbki;
- 0,01 ml inhibitora enzymatycznego (PMSF);
- 0,1 ml buforu;
- wymieszać w mieszadło wirowym typu vortex.

Należy przygotować dla każdej próbki po 4 próbki i włożyć je do dwóch stojaków:

- 2 próbki do inkubacji w temperaturze 37°C (oznaczone jako 37);
- 2 próbki do inkubacji w kąpiel lodowej (oznaczonych jako 4).

Te próbki zostaną wykorzystane do oznaczenia radioimmunologicznego.

- pipetować 0,1 ml próbki z dodatkiem inhibitora w każdej próbce. Umieścić serię 4 w kąpiel lodowej a serię 37 - w łaźni wodnej w temperaturze 37°C.
- okres inkubacji wynosi 3 godziny, jeżeli jest stosowany bufor generacyjny o pH 7,4 lub 90 minut, jeżeli jest stosowany bufor generacyjny o pH 6,0.
- pod koniec inkubacji należy włożyć próbki serii 37 do kąpeli lodowej, w której znajdują się próbki serii 4. Następnie wykonywane jest RIA.

4.2 Procedura radioimmunologiczna

Należy włożyć poniższe zestawy próbek do kąpeli lodowej wraz z dwoma seriami próbek zawierających próbki badane:

- 2 próbki do całkowitej radioaktywności;
- 2 próbki do NSB (bez dodanej antysurowicy);
- 2 próbki do B0;
- 2 próbki dla każdego standardu;
- Pipetować 0,1 ml standardu '0' do próbek B0;
- Pipetować 0,2 ml standardu '0' do próbek NSB;
- Pipetować 0,1 ml każdego standardu do odpowiednio oznaczonych próbek;
- Do wszystkich próbek dodać 0,1 ml znacznika reninowego;
- Dodać 0,1 ml antysurowicy reninowej do wszystkich próbek, z wyjątkiem próbek do zliczania całkowitej radioaktywności.
- Mieszać za pomocą mieszadła wirowego typu vortex a następnie inkubować przez 18-20 godzin w kąpiel lodowej, włożonej do lodówki (4°C).
- Pod koniec inkubacji, wyjąć kąpiel lodową z lodówki i (przechowując próbki w kąpiel lodowej) dodać 1 ml odczynnika separacyjnego reninowego do wszystkich próbek, z wyjątkiem próbek do zliczania całkowitej radioaktywności. W trakcie dozowania należy okresowo mieszać drugie przeciwciasto magnetyczne, w celu zapewnienia jednorodności.
- Przy pomocy mieszadła typu vortex należy wymieszać cały stojak, wyjąć stojak z kąpeli lodowej i inkubować przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Wyjąć próbki do całkowitego zliczania ze stojaka i wsunąć stojak do separatora magnetycznego, sprawdzając czy denka próbek są w kontakcie z powierzchnią separatora.
- Pozostawić zawieszinę magnetyczną na 10 minut w celu wytrącenia osadu.
- Odwracając separator magnetyczny należy osuszyć próbki, następnie umieścić odwrócony separator na bibule absorpcyjnej, w celu usunięcia kropli płynu przylegających do bocznych ścianek próbek.
- Zliczać wszystkie próbki, wraz z tymi do całkowitej radioaktywności, przez co najmniej 1 minutę w liczniku gamma.

4.3 Schemat procedury testu – (Objętości są wyrażone w ml)

Probówki Odczynniki	Próbka "4"- "37"	B0	Standard	NSB	Całkowita radioaktywność
Próbka	0,1 - 0,1	-	-	-	-
Standard zerowy	- -	0,1	-	0,2	-
Standardy	- -	-	0,1	-	-
Znacznik	0,1 - 0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Antysurowica	0,1 - 0,1	0,1	0,1	-	-
Mieszać za pomocą mieszadła wirowego typu vortex, a następnie inkubować przez 18-20 godzin w temperaturze 4°C w kąpeli lodowej, włożonej do lodówki; Pod koniec inkubacji należy wyjąć kąpiel lodową z próbkami z lodówki.					
Odczynnik separacyjny	1,0 - 1,0	1,0	1,0	1,0	-
Potrząsać statyw na mieszadło wirowe i inkubować przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Wyjąć próbki do całkowitego zliczania. Wsunąć stojak do separatora magnetycznego i odczekać 10 minut. Zliczać wszystkie próbki, w tym próbki do zliczania całkowitej radioaktywności, przez co najmniej 1 minutę w liczniku gamma.					

8. OBLICZENIA I WYNIKI

Średnie wartości zliczeń NSB mogą zostać odjęte od wszystkich średnich wartości zliczeń z wyjątkiem wartości dla całkowitej radioaktywności. Średnie wartości zliczeń B0 są wykorzystane do wyliczenia % wiązania w nieobecności zimnego antygenu (wiązanie maksymalne).

$$\frac{\text{Średnie wartości zliczeń B0}}{\text{Średnie wartości zliczeń całkowitej radioaktywności}} \times 100 = \% \text{ wiązania}$$

% względnego wiązania standardu i próbek jest wyliczany przy pomocy następującego wzoru:

$$\frac{\text{Średnie wartości zliczeń (standard, próbka)}}{\text{Średnie wartości zliczeń B0}} \times 100 = \% \text{ względnego wiązania}$$

Narysować krzywą zależności od dawki poprzez wykreślenie % względnego wiązania każdego standardu (oś y) wobec stężenie względnego (oś x) na papierze półlogarytmicznym. Poprzez naniesienie na krzywą standardową % względnego wiązania każdej próbki, otrzymuje się stężenie antygenu w próbce w ng/ml. Aktywność reninowa osocza (plasmatic renin activity (PRA)) jest wyliczana w jednostkach ng/ml/godzinę, według następującego wzoru:

$$\text{PRA} = \frac{(\text{ng/ml "37"} - \text{ng/ml "4"}) \times 1,11^*}{\text{Godziny}^{**}} \text{ ng/ml/godzinę}$$

*1,11: Współczynnik rozcieńczenia próbki po dodaniu PMSF i buforu generacyjnego.

Godziny**: Czas inkubacji dla generacji angiotensyny I.

W celu komputeryzacji danych zaleca się skorzystanie z bibliografii (11, 12). Użytkownik może dokonać wyboru, zgodnie z charakterystyką oznaczenia, metody obliczeń i wyrażenia graficznego, które pozwalają na zastosowanie wyników w najlepszy sposób.

1. Przykład obliczenia - Odzwierciedlenie krzywej standardowej

Probówki	Średnia zliczeń/ml n.	B/T (%)	B/BO (%)	Stężenie (ng/ml)
Całkowita radioaktywność	26114	-	-	-
NSB	274	1,05	-	-
B0	21217	81,25	-	-
St. 0,2 ng/ml	18458	-	86,8	-
St. 0,5 ng/ml	15002	-	70,3	-
St. 1,0 ng/ml	10906	-	50,8	-
St. 2,0 ng/ml	7060	-	32,4	-
St. 5,0 ng/ml	3551	-	15,6	-
St. 10,0 ng/ml	2077	-	8,6	-
St. 25,0 ng/ml	1064	-	3,8	-
Próbka 1 ("4")	17053	-	80,12	0,31
Próbka 1 ("37")	2103	-	8,73	9,84

$$\text{Próbka 1} = \frac{(9,84 - 0,31) \times 1,11}{1,5} = 7,05 \text{ ng/ml/godzinę.}$$

WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach. Nie wolno zamrażać i rozmrażać więcej niż jeden raz.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

9. OGRANICZENIA

1. Aby uzyskać właściwe wyniki konieczne jest dokładne przestrzeganie instrukcji przedstawionych w ulotce opakowania.
2. Nie wolno stosować odczynników z przekroczoną datą ważności przedstawioną na etykietach fiolek.
3. Nie wolno mieszać odczynników pochodzących z różnych serii.
4. Po rozpuszczeniu odczynników należy przechowywać w temperaturze 4°C przez 3 dni w zamkniętych probówkach. Po rozpuszczeniu i po przechowywaniu w temperaturze 4°C, odczynniki mogą być zastosowane tylko raz. W celu przechowywania przez okres dłuższy niż 3 dni, należy zamrozić odczynniki w temperaturze -20°C. Po zamrożeniu należy stopniowo ogrzewać odczynniki do temperatury pokojowej, unikając wykorzystywania łaźni wodnej (37°C). Należy unikać rozmrażania odczynników więcej niż 1 raz.
5. Próbki skażone endogenną radioaktywnością mogą prowadzić do niedokładnych wyników.
6. Ponieważ wytwarzanie (generacja) angiotensyny I jest funkcją liniową w czasie, w przypadku próbek podejrzanym o niską aktywność reniny (poniżej 0,15 ng/ml/godzinę) możliwe jest wydłużenie okresu generacji, w celu zwiększenia czułości oznaczenia. W podobny sposób możliwe jest odczytanie wartości krzywej standardowej, która może znajdować się poza krzywą standardową (szczegóły dotyczące krzywej generacyjnej w rozdziale 8).
7. Aktywność reninowa osocza jest ściśle związana z przyjmowaniem sodu przez pacjenta. Aby uzyskać pełne dane dotyczące stanu klinicznego, konieczne jest oznaczenie zarówno aktywności reninowej osocza, jak i wydalania sodu z moczem.

10. WARTOŚCI OCZEKIWANE

Próbka 1	Aktywność reninowa osocza ng/ml/godzinę	
	pH 6,0	pH 7,4
Pozycja stojąca	0,98 – 4,18	0,15 – 2,12
Pozycja leżąca	0,51 – 2,64	0,12 – 1,59

Zakres został obliczony dla pacjentów, których wydalanie sodu z moczem wynosi około 100 mEq/24 godziny. Zaleca się aby każde laboratorium opracowało własne zakresy referencyjne.

11. CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA

1. Dokładność

Badania odzysku przeprowadzono poprzez dodanie angiotensyny I do próbek zbiorczego osocza. Wartości angiotensyny I były oznaczane przed i po dodaniu. Następnie obliczano % odzysku dodanej angiotensyny.

Próbka	Angiotensyna I Dodano (ng/ml)	Angiotensyna I Zmierzone (ng/ml)	Odzysk (%)
1	0	1,4	-
	10	10,29	88,9
	5	6,17	95,3
	2	3,45	102,3
	1	2,43	103,0
	0,5	1,94	107,0
2	0	1,97	-
	10	12,22	102,5
	5	6,42	89,0
	2	3,85	94,3
	1	2,97	100,7
	0,5	2,46	98,8
3	0	3,21	-
	10	13,90	106,9
	5	8,25	100,8
	2	5,37	108,0
	1	4,30	109,0
	0,5	3,67	92,0

2. Test rozcieńczeń

W badaniu rozcieńczeń, próbki zostały rozcieńczone za pomocą standardu zerowego. Rozcieńczenia przeprowadzono po generacji angiotensyny. Poniżej przedstawiono oznaczony % odzysku:

Próbka	Współczynnik rozcieńczeń	Angiotensyna I Zmierzone (ng/ml)	Odzysk %
1	-	14,51	-
	2	7,38	101,7
	4	3,92	108,1
	8	1,83	101,1
	16	0,83	91,7
	32	0,39	85,6
2	-	19,74	-
	2	9,77	99,0
	4	5,11	103,5
	8	2,48	100,5
	16	1,15	93,2
	32	0,6	97,3
3	-	20,18	-
	2	9,66	95,7
	4	5,05	100,1
	8	2,51	99,5
	16	1,14	90,1
	32	0,62	97,7

3. Precyzja

Współczynnik zmienności (C.V.) wewnątrz testu został oznaczony w surowicach zbiorczych, mierzonych 20-krotnie w tym samym oznaczeniu. Zmienność w ramach serii została przedstawiona poniżej:

Próbka	Średnia (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. %
1	2,86	0,15	5,1
2	4,66	0,28	6,04
3	6,41	0,22	3,39

Współczynnik zmienności (C.V.) pomiędzy testami został określony na podstawie kilku punktów, wzdłuż krzywej standardowej, w 10 różnych oznaczeniach. Zmienność pomiędzy seriami jest przedstawiona poniżej:

Próbka	Średnia (ng/ml)	S.D. (ng/ml)	C.V. %
1	2,96	0,15	5,15
2	4,61	0,19	4,18
3	6,33	0,24	3,82

4. Czułość

Granica detekcji oznaczenia, określona jako stężenie równoważnika angiotensyny I do średnich zliczeń 20 kolejnych oznaczeń standardu zerowego, mniejszych niż dwa odchylenia standardowe, wynosi 0,033 ng/ml.

5. Swoistość

Swoistość badania układu reninowego została oceniona poprzez pomiar przybliżonej odpowiedzi testu na anality, potencjalnie reagujące krzyżowo. Procent interferencji został obliczony metodą Abraham'a ($x/y \times 100$), gdzie x i y odpowiadają masie angiotensyny I i składnika interferującego, który prowadzi do zmniejszenia pojemności wiązania o 50%.

Odczynnik krzyżowy	Reaktywność krzyżowa
Angiotensyna I	100,00 %
Angiotensyna II	0,0023 %
Angiotensyna III	0,02 %
Fragment angiotensyny 1-13	0,32 %
Pentapeptyd angiotensyny II	0,015 %

БЪЛГАРСКИ

САМО ЗА IN VITRO ДИАГНОСТИКА

R-EX-125 125 Измервания

1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Радиоимунно изследване за измерване на активността на плазмения ренин в човешка плазма.

2. ОБЯСНЕНИЕ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Системата ренин-ангиотензин-алдостерон е хормонална „каскадна“ система, чийто първи компонент се представлява от ангиотензиногена. Ренинът, протеолитичен ензим, трансформира ангиотензиногена в ангиотензин I а полипептид, който не притежава биологична активност. Ангиотензин I е субстратът върху който въздейства преобразуващия ензим, произвеждащ биологично активен ангиотензин II. Основната биологична активност на ангиотензин II се състои във вазоконстрикция, регулиране синтеза и освобождаването на алдостерон, който модулира електролитния баланс. Така системата е ангажирана в регулиране на кръвното налягане по няколко механизма. Активността на системата може да се оцени чрез измерване на активността на плазмения ренин, тъй като изследванията на ангиотензин I и ренин са свързани с някои методологични проблеми (ниски стойности на първия, наличието на структурно подобни ензими при втория). Ренинът се синтезира в юкта-гломерулния апарат на бъбрека и е с молекулно тегло около 40.000 Da. Измерването на неговата активност е валиден инструмент за определянето на прогноза и терапия на пациенти, страдащи от артериална хипертензия. Въпреки това е важно да се знаят някои фактори, които биха могли да променят стойностите на показатели, като: прием на натрий, изправено и лежачо положение и медикаменти. Активността на плазмения ренин се повишава с намаляване приема на натрий и се понижава при преминаване от изправено в легнало положение. Освен това, някои медикаменти, като диуретици или орални контрацептиви, могат да предизвикат повишаване, докато други, като L-допа, резерпин - понижаване на бъбречната активност.

Хиперренинизъмът може да се дължи на няколко причини:

- Хиперренинизъм с артериална хипертензия: ренално-съдова хипертензия, тумор на Вилмс, синдром на Робъртс-Кихара.
- Хиперренинизъм без артериална хипертензия: хипонатриемия, нефротични синдроми, синдром на Бартер.

Хипоренинизъмът може да се дължи на няколко причини:

- Хипоренинизъм с артериална хипертензия: Синдром на Кон, първичен псевдо хипералдостеронизъм, синдром на Биглиери, някои случаи на есенциална хипертензия.
- Хипоренинизъм без артериална хипертензия: хипоалдостеронизъм, задържане на соли, понижена активност на симпатичната нервна система.

В някои случаи може да се окаже полезна оценката на изменението в активността на плазмения ренин след динамични тестове. Един от най-полезните тестове е стимулацията с фуросемид.

3. ПРИНЦИП НА МЕТОДА

Наборът е предназначен за измерване на активността на плазмения ренин чрез радиоимунно изследване на ангиотензин I. Преди радиоимунното изследване плазмата трябва да се инкубира така, че ренинът да синтезира ангиотензин I в стандартизирани условия. Ензимният инхибитор препятства разлагането на ангиотензин I под въздействието на ензимите при синтеза.

Процедурата предвижда потребителят да избере pH за синтеза.

Китът дава възможност за извършване на плазмен синтез при две различни pH:

- Буфер за синтез с pH 6.0, използващ флакона, доставен с реагентите на кита.
- Буфер за синтез с pH 7.4, използващ флакон, доставян само по заявка.

Синтезът при pH 7.4 е същият процес, който се извършва в човешката физиология и блокира активността на останалите плазмени ензими.

Синтезът при pH 6.0 произвежда количество, два пъти по-голямо от това при pH 7.4, ето защо методът pH 6.0 е по-надежден при измерването на проби с по-ниска активност на плазмения ренин.

Синтезът на ангиотензин е линейна функция на времето, ето защо при промяна на времето на синтез се получават същите резултати. Въпреки това процедурата предвижда 90 минутна инкубация при pH 6.0 и 3-часова инкубация при pH 7.4, за да се стандартизира методът и да се гарантира добра прецизност. След синтеза се извършва и самото радиоимунно изследване. Антигенът от калибраторите или от пробите се конкурира с радиоактивния трейсър (натоварен с I^{125} -ангиотензин) за свързващи центрове на анти тялото. След инкубацията количеството трейсър, свързан към анти тялото, е обратно пропорционално на количеството на наличния в калибраторите или пробите ангиотензин. Извършва се В/Ф сепарация чрез добавяне на двойно анти тяло, съединено с магнитни частици. Прилагането на магнитно поле позволява утаяването на имунокомплексите, което прави ненужен етапът центрофугиране.

Основните етапи на радиоимунното изследване са:

- инкубация на реакционната смес за 18-20 часа при 4°C;
- В/Ф сепарация чрез добавяне на двойно анти тяло, съединено с магнитни частици;
- преливане на супернатант;
- броење на радиоактивността с гама брояч.

4. РЕАГЕНТИ

Не разменяйте реагентите на китовите от различни партии. Партидните номера на реагентите трябва да бъдат указани в „Удостоверението за анализ“. Не използвайте компоненти на кита с изтекъл срок на годност.

Китът за измерване на ренина съдържа достатъчно количество реагенти за 125 епруветки. При получаването на кита го съхранявайте при 2-8°C до изтичане на указания на етикета срок на годност.

- Ренин трейсър (червен), 1 флакон:** Съдържа натоварен с I^{125} ангиотензин във фосфатен буфер с волски серумен албумин и натриев азид 0.05%. 13.0 ml във всеки флакон. Максимална радиоактивност: 85 kBq. Срокът на годност е указан на етикета на флакона. Реагентът е готов за употреба. Съхранявайте при температура 2-8°C.
- Ренин калибратори, 8 флакона:** Съдържат: 0- 0.2- 0.5- 1.0- 2.0- 5.0- 10.0- 25.0 ng/ml лиофилизиран ангиотензин I във фосфатен буфер с волски серумен албумин и натриев азид 0.2% w/v. Срокът на годност е указан на етикета на флакона. Реконституирайте съдържанието на нулевия калибратор с 2 ml дестилирана вода, а останалите калибратори - с 1 ml дестилирана вода. Разбъркайте нежно до пълното разтваряне на лиофилизираната утайка. Съхранявайте при 2-8°C за 1 ден или при -20°C за по-продължителни периоди от време.
- Ренин антисерум, (цветови код: зелен), 1 флакон:** Съдържа лиофилизиран заешки анти-ангиотензин I във фосфатен буфер със заешки гамаглобулин, волски серумен албумин и натриев азид 0.05% w/v. Срокът на годност е указан на етикета на флакона. Реконституирайте съдържанието на флакона с 12.5 ml дестилирана вода и разбъркайте нежно до пълното разтваряне на лиофилизираната утайка. Съхранявайте при 2-8°C за 3 дена или при -20°C за по-продължителни периоди от време.
- Ренин сепарационен реагент, 1 флакон:** Съдържа кози анти-заешки гамаглобулин, съединен с магнитни частици в трис буфер с волски серумен албумин и натриев азид <0.1 % w/v. 125 ml. Срокът на годност е указан на етикета на флакона. Разтворът е готов за употреба. Съхранявайте при 2-8°C. Не замразявайте.
- Ренин буфер за синтез, pH 6.0, 1 флакон:** Съдържа 6.0 ml фосфатен буфер с жълта боя. Срокът на годност е указан на етикета на флакона. Суспензията е готова за употреба. Съхранявайте при 2-8°C. Не замразявайте.
- Ренин буфер за синтез, pH 7.4, 1 флакон (доставя се по заявка):** Съдържа 3.0 ml фосфатен буфер с боя (оранжев цвят). Срокът на годност е указан на етикета на флакона. Разтворът е готов за употреба. Съхранявайте при 2-8°C. Не замразявайте.

- Ренин ензимен инхибитор, 1 флакон:** Съдържа фенилметил-сулфонил флуорид (PMSF) в етилов алкохол. 0.5 ml. Съхранявайте при 2-8°C. Ако разтворът кристализира след съхранение при 4°C, го оставете при 37°C във флакон със стопорна пробка. Предупреждение: Не съхранявайте отворения флакон след употреба. Разтворът е готов за употреба.

5. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ ЗА ПОТРЕБИТЕЛЯ

Само за *in vitro* диагностика.

Този тест може да се използва само от квалифициран лабораторен персонал, като боравенето с него трябва да бъде в съответствие с изискванията на Добрата лабораторна практика. Радиоактивен материал - не е предназначен за вътрешна или външна употреба при хора и животни.

Този радиоактивен материал може да бъде получен, придобит, притежаван и използван само от доктори, клинични лаборатории или болници и само за *in vitro* клинични или лабораторни тестове, изключващи вътрешно или външно прилагане на материала или радиацията в него на хора или животни. Неговото получаване, придобиване, притежаване, употреба и прехвърляне трябва да се извършва съгласно законодателството и стандартите в държавата.

Физични характеристики на I^{125} : вижте в края на инструкциите.

- Предпазни мерки:** При боравенето с радиоактивен материал спазвайте стриктно следните инструкции:
 - o Съхранявайте радиоактивните материали в предназначената за целта зона.
 - o Не яжте, не пийте, не пушете и не използвайте козметични средства в близост до места, в които се оперира с радиоактивен материал.
 - o Не пипетирайте с уста.
 - o Носете ръкавици, когато боравите с радиоактивен материал, и измивайте ръцете си с голямо количество вода.
 - o Покрийте работната зона с абсорбираща хартия за еднократна употреба.
 - o Избърсвайте разлетия материал незабавно и напълно и изхвърляйте контейнерите с радиоактивни материали като радиоактивен отпадък.
 - o Изхвърляйте течния радиоактивен отпадък в санитарната канализация само ако това е позволено от местните разпоредби.
- ОПАСНИ ХИМИКАЛИ, предупреждение за наличието на натриев азид (NaN₃):** Някои от реагентите в този кит съдържат натриев азид като консервант. При тези реагенти неговата концентрация е <0.1% w/w. Натриевият азид може да реагира с оловните и медни канализационни тръби и да образува експлозивни метални азиди. Изхвърляйте всички нерадиоактивни реагенти, като след това промийте канализационната система с големи количества вода.
Рискови фрази
R 21/22 Вредно при контакт с кожата и при поглъщане.
Защитни фрази
S-26 В случай на контакт с очите промийте незабавно с обилно количество вода и потърсете лекарска помощ.
S-28.1 След контакт с кожата промийте незабавно с обилно количество вода.
S-46 При поглъщане потърсете незабавно лекарска помощ и покажете контейнера или етикета.
- ПОТЕНЦИАЛНО БИОЛОГИЧНО ОПАСЕН МАТЕРИАЛ:** Този кит може да съдържа реагенти, съдържащи човешки серум или плазма. Използваните серум или плазма са били тествани по одобрен от FDA (Американската агенция за храните и лекарствата) метод и е било установено, че не съдържат антитела за HIV-1/2, HCV и HBsAg. Тъй като никой метод не може да гарантира пълна сигурност, че липсват HIV-1/2, HCV, HBsAg или други инфекциозни агенти, с тези реагенти трябва да се борави на Ниво 2 за биологична защита, както се препоръчва и за всички потенциално заразни човешки серумни или кръвни проби в Наръчника за здравеопазване на Центровете за контрол на заболяванията/ на Националните институти "Биологична защита в микробиологичните и биомедицинските лаборатории," 3-то издание, 1993 година.

6. ВЗИМАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ПРОБИТЕ

Взимайте пробите на стайна температура. Не охлаждайте епруветката за EDTA-Na₂ (2 mg/ml кръвна проба) и не съхранявайте епруветката за взимане на проби върху лед.

Центрофугируйте епруветката в неохладена центрофуга и отделете плазмата от клетките веднага след центрофугирането, след това разделете на аликвоти и охладете веднага. Не замразявайте. Криоактивиране, т.е. нискотемпературно преобразуване на протеина в ренин, настъпва при охлаждане или излагане на пробите на температури от 6°C или по-ниски за продължителни периоди от време и когато пробите са охладени, но остават в течно състояние (т.е. не замразени) (12, 13). Преди анализа пробите трябва да бъдат бързо размразени до стайна температура чрез поставянето им в хладка вода. Пациентите, приемащи диуретици, антихипертензивни медикаменти, вазодилатори, орални контрацептиви и лакрица трябва да прекъснат употребата на тези вещества за две до четири седмици преди изследването. Трябва да отбележим, че нивата на ренин се повишават по време на бременност и на диети с намален прием на сол. Също така, тъй като ренинът се влияе от положението на тялото, както и поради денонощната му променливост, кръвните проби трябва да се взимат сутрин, при което трябва да се отбележи и положението на пациента (седнал или легнал). След синтеза на ангиотензин I може да се извърши евентуално разреждане с включения в кита нулев калибратор.

Предупреждение:

- Не използвайте хепарина като антикоагулант, тъй като той нарушава синтеза на ангиотензин I.
- Не използвайте хемолизирани проби.

7. ПРОЦЕДУРА НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

1. Осигурени материали

Ренин китът (R-EX-125) е предвиден за 125 епруветки и съдържа следните реагенти:

Реагенти	Количество
Ренин антисерум	1
Ренин калибратори	8
Ренин трейсър	1
Ренин сепарационен реагент	1
Ренин буфер за синтез pH 6.0	1
Ренин ензимен инхибитор	1

2. Реагенти, невяклучени в кита, доставяни само по заявка:

Ренин буфер за синтез pH 7.4 - код: R-EX-LC.

3. Необходими материали и оборудване, невяклучени в кита:

- дестилирана вода;
- пластмасови епруветки (около 1 x 7);
- водна баня при 37°C;
- градуирани пипети;
- ледена баня;
- автоматични микропипети с накрайници за еднократна употреба (0.01 - 0.1 ml);
- хладилник за 4°C;
- завихрящ смесител;
- устойчива стойка: стойката за 50 епруветки за еднократна употреба да бъде поставена в магнитния сепаратор;
- магнитен сепаратор: магнитна плоча за B/F сепарация;
- гама брояч.

4. Тестова процедура

4.1 Синтез на ангиотензин I

Потребителят може да избере pH за синтеза, като използва буфер за синтез pH 7.4 (оранжев разтвор - доставя се само по заявка) или буфер за синтез pH 6.0 (жълт разтвор - включен е в кита). Следвайте доуописаната процедура и в двата случая, добавяйте към пластмасовите епруветки, като следвате указания ред:

- 1.0 ml проба;
- 0.01 ml ензимен инхибитор (PMSF);
- 0.1 ml буфер;
- смесете в завихрящ смесител;

За всяка проба пригответе 4 епруветки и ги поставете в 2 стойки:

- 2 епруветки за инкубация на 37°C (маркирана 37);
- 2 епруветки за инкубация в ледена баня (маркирана 4).

Тези епруветки ще се използват при радиоимунното изследване.

- накапете с пипета 0.1 ml проба, третирана с инхибитор във всяка епруветка. Поставете сериите „4” в ледена баня, а сериите „37” - във водна баня при 37°C.
- инкубационното време е 3 часа при използването на буфер за синтез pH 7.4 или 90 минути при използването на буфер за синтез pH 6.0.
- след завършване на инкубацията поставете епруветките от серията „37” в ледената баня, в която са поставени епруветките от серията „4”. След това проведете радиоимунното изследване.

4.2 Процедура на радиоимунното изследване

Поставете следните групи епруветки в ледена баня, заедно с двете серии епруветки с пробите:

- 2 епруветки за преброяване на общата радиоактивност;
- 2 епруветки за неспецифично свързване (NSB);
- 2 епруветки за B0;
- 2 епруветки за всяка стандартна концентрация;
- Накапете с пипета 0.1 ml нулев калибратор в епруветките за B0;
- Накапете с пипета 0.2 ml нулев калибратор в епруветките за неспецифично свързване (NSB);
- Накапете с пипета 0.1 ml от всеки калибратор в удобно маркираните епруветки;
- Добавете 0.1 ml ренин трейсър във всички епруветки;
- Добавете 0.1 ml ренин антисерум във всички епруветки, освен тези за преброяването на общата радиоактивност;
- Смесете в завихрящ смесител и инкубирайте за 18-20 часа в ледена баня, поставена в хладилник (4°C);
- След инкубацията извадете ледената баня от хладилника и като държите постоянно епруветките в нея, добавете 1 ml ренин сепарационен агент към всяка епруветка, освен тези за преброяването на общата радиоактивност. При разделянето второто магнитно антиляло трябва да бъде разбърквано от време на време, за да се постигне хомогенност.
- Поставете цялата стойка в завихрящ смесител; извадете стойката от ледената баня и инкубирайте за 10 минути на стайна температура. Извадете епруветките за преброяване на общата радиоактивност от стойката и я приплъзнете в магнитния сепаратор; проверете дали дъната на епруветките са в контакт с повърхността на сепаратора.
- Оставете магнитната суспензия да се утаи за 10 минути.
- Прелейте епруветките, като обърнете магнитния сепаратор, поставете обърнатия сепаратор върху попивателна хартия, за да отстраните капките течност, прилепнали по стените на епруветките.
- Направете преброяване на всички епруветки, включително на тези за преброяване на общата радиоактивност в продължение на най-малко 1 минута с гама брояч.

4.3 Схема на тестовата процедура - (обемите са изразени в ml)

Епруветки Реагенти	Проба “4”-“37”	B0	Калибратор	NSB	Обща ради- оактивност
Проба	0,1 - 0,1	-	-	-	-
“0” калибратор	- -	0,1	-	0,2	-
Калибратори	- -	-	0,1	-	-
Трейсър	0,1 - 0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Антисерум	0,1 - 0,1	0,1	0,1	-	-
Смесете в завихрящ смесител и инкубирайте за 18-20 часа при 4°C в ледена баня, която трябва да се постави в хладилник. След като инкубацията завърши, извадете ледената баня заедно с епруветките от хладилника.					
Реагент за сепарация	1,0 1,0	1,0	1,0	1,0	-
Смесете стойката в завихрящ смесител и инкубирайте за 10 минути на стайна температура. Извадете епруветките за преброяване на общата радиоактивност. Приплъзнете стойката в магнитния сепаратор и изчакайте 10 минути. Измерете всички епруветки, включително тези за общата радио-активност, за най-малко 1 минута в гама брояч.					

8. ИЗЧИСЛЕНИЯ И РЕЗУЛТАТИ

Средното аритметично от преброяванията за неспецифично свързване може да се извади от средното аритметично от всички преброявания, с изключение на тези на общата радиоактивност. Средното аритметично от преброяванията на B0 се използва за изчисляване на процента свързване при липсата на студен антиген (максимално свързване).

Средно аритметично от преброяванията на B0
----- x 100 = % свързване
Ср.аритм. от пребр.на общата радиоактивност

Процентът на относително свързване на калибраторите и пробите се изчислява по следната формула:

Ср.аритмет. от пребр. (калибратор, проба)
----- x 100 = % относително свързване
Ср.аритметично от преброяванията на B0

Начертайте кривата на дозовата зависимост, като нанесете процента относително свързване на всеки калибратор (по оста y) и относителната концентрация (по оста x). Използвайте семилогаритмична хартия.

Чрез интерполация от калибрационната крива „Процент на относителното свързване на всяка проба“ можете да получите концентрацията на антигените в пробата, изразена в ng/ml. Активността на плазмения ренин (PRA) се изчислява като ng/ml/час по следната формула:

$$PRA = \frac{(\text{ng/ml "37"} - \text{ng/ml "4"}) \times 1.11^*}{\text{Часове}^{**}} \text{ ng/ml/час}$$

*1.11: Коефициент на разреждане на пробата след добавяне на PMSF и буфер за синтез.

**Часове: Период на инкубация за синтеза на ангиотензин I.

За информация относно компютърно-асистирани методи вижте библиографията (11, 12). Потребителят може да избере, съобразно характеристиките на изследването, метод на изчисляване и графичен израз, позволяващи най-добрата обработка на данните.

1. Пример за представителна за изчисленията калибрационна крива

Епруветки	Средно срп	В/Т (%)	В/В0 (%)	Концентрация (ng/ml)
Обща радиоактивност	26114	-	-	-
Неспецифична свързаност	274	1,05	-	-
B0	21217	81,25	-	-
Кал. 0,2 ng/ml	18458	-	86,8	-
Кал. 0,50 ng/ml	15002	-	70,3	-
Кал. 1,0 ng/ml	10906	-	50,8	-
Кал. 2,0 ng/ml	7060	-	32,4	-
Кал. 5,0 ng/ml	3551	-	15,6	-
Кал. 10,0 ng/ml	2077	-	8,6	-
Кал. 25,0 ng/ml	1064	-	3,8	-
Проба 1 ("4")	17053	-	80,12	0,31
Проба 1 ("37")	2103	-	8,73	9,84

$$\text{Проба 1} = \frac{(9.84 - 0.31) \times 1.11}{1.5} = 7,05 \text{ ng/ml/час.}$$

ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- По желание, всяка лаборатория може да направи собствен набор от контролни проби, които да съхранява замразени в аликвоти.
- Критериите за приемане на разликата между резултатите от изследването на две еднакви проби трябва да са базирани на Добрата лабораторна практика.

9. ОГРАНИЧЕНИЯ

1. За да получите надеждни резултати, спазвайте стриктно дадените в приложените към този пакет инструкции.
2. Не използвайте реагентите след изтичане срока на годност, указан на етикетите на флаконите.
3. Не смесвайте реагенти от различни партиди.
4. След реконституиране съхранявайте реагентите при 4°C за 3 дена във флакони със стопорни пробки. След реконституиране и съхранение при 4°C реагентите могат да се използват само веднъж. За съхраняване за период, по-дълъг от 3 дена, замразете реагентите при -20°C. След замразяването оставете реагентите да достигнат постепенно стайна температура; не използвайте водна баня при 37°C.
Не размразявайте реагентите повече от 1 път.
5. Контаминираният с екзогенна радиоактивност проби могат да дадат неточни резултати.
6. Тъй като синтезът на ангиотензин I е линейна функция на времето, е възможно времето на синтез при проби, при които се очаква понижена активност на ренина (под 0.15 ng/ml/час) да се увеличи, за да се повиши чувствителността на теста. Така по калибрационната крива ще може да се отчете стойност, която е извън кривата (вижте крива на синтеза в раздел 8).
7. Активността на плазмения ренин е в тясна взаимозависимост с приема на натрий от пациента. Ето защо, за да се получи картина на цялостното клинично състояние, трябва да се измерят екскретираните с урината натрий и активността на плазмения ренин.

10. ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ

Проба	Активност на плазмения ренин ng/ml/час	
	pH 6,0	pH 7,4
Изправено положение	0,98 - 4,18	0,15 - 2,12
Легнало положение	0,51 - 2,64	0,12 - 1,59

Интервалът е изчислен на базата на пациенти с нива на екскретирания с урината натрий около 100 mEq/24 hours. Препоръчително е всяка лаборатория да установи свой собствен интервал на референтните стойности.

11. ФУНКЦИОНАЛНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ

1. Точност

Бяха проведени възстановителни тестове чрез добавяне на ангиотензин I към набора плазмени проби. Стойностите на ангиотензин I бяха определени преди и след добавянето, бе изчислен и процентът възстановяване на добавения ангиотензин.

Проба	Ангиотензин I Добавен (ng/ml)	Ангиотензин I Измерен (ng/ml)	Възстановяване %
1	0	1,4	-
	10	10,29	88,9
	5	6,17	95,3
	2	3,45	102,3
	1	2,43	103,0
	0,5	1,94	107,0
2	0	1,97	-
	10	12,22	102,5
	5	6,42	89,0
	2	3,85	94,3
	1	2,97	100,7
	0,5	2,46	98,8
3	0	3,21	-
	10	13,90	106,9
	5	8,25	100,8
	2	5,37	108,0
	1	4,30	109,0
	0,5	3,67	92,0

2. Разреждане

В тест с разреждане пробите бяха разредени с нулев калибратор. Разреждането може да се извърши след синтеза на ангиотензин. Измерените стойности на % възстановяване са дадени по-долу:

Проба	Коефициент на разреждане	Ангиотензин I Измерен (ng/ml)	Възстановяване %
1	-	14,51	-
	2	7,38	101,7
	4	3,92	108,1
	8	1,83	101,1
	16	0,83	91,7
	32	0,39	85,6
2	-	19,74	-
	2	9,77	99,0
	4	5,11	103,5
	8	2,48	100,5
	16	1,15	93,2
	32	0,6	97,3
3	-	20,18	-
	2	9,66	95,7
	4	5,05	100,1
	8	2,51	99,5
	16	1,14	90,1
	32	0,62	97,7

3. Прецизност

Коефициентът на вариация в рамките на изследването (C.V.) бе определен на базата на серумни набори, измерени 20 пъти в рамките на едно и също изследване. Коефициентът на вариация в рамките на изследването е показан на долната таблица:

Проба	Средно аритметично (ng/ml)	Стандартно отклонение (ng/ml)	Коефициент на вариация %
1	2,86	0,15	5,1
2	4,66	0,28	6,04
3	6,41	0,22	3,39

Коефициентът на вариация в рамките на изследването (C.V.) бе определен в няколко точки от калибрационната крива при 10 различни изследвания. Вариацията между изследванията е показана на долната таблица:

Проба	Средно аритметично (ng/ml)	Стандартно отклонение (ng/ml)	Коефициент на вариация %
1	2,96	0,15	5,15
2	4,61	0,19	4,18
3	6,33	0,24	3,82

4. Чувствителност

Прагът на чувствителност на изследването, дефиниран като концентрацията на ангиотензин I, еквивалентен на средното от преброяванията на 20 броя нулев калибратор минус две стандартни отклонения, е обикновено 0.033 ng/ml.

5. Специфичност

Специфичността на набора за изследване на ренина е определена чрез измерване на очевидната реакция на изследването на анализирани вещества с потенциална кръстосана реактивност. Процентът кръстосана реактивност бе изчислен по метода на Ейбрахам ($x/y \times 100$), където x и y са съответно теглото на ангиотензин I и на веществото с кръстосана реактивност, което води до намаляване с 50% на свързващата радиоактивност.

Вещество с кръстосана реактивност	Кръстосана реактивност
Ангиотензин I	100,00 %
Ангиотензин II	0,0023 %
Ангиотензин III	0,02 %
Ангиотензин Фрагмент 1-13	0,32 %
Ангиотензин II пентапептид	0,015 %

12. BIBLIOGRAPHIE – BIBLIOGRAPHY – BIBLIOGRAFÍA – BIBLIOGRAPHIE – BIBLIOGRAFIA – BIBLIOGRAFIA – БИБЛИОГРАФИЯ

1. Kosimen and Pakarinen - Correlation between plasma renin activity, Angiotensin and Aldosterone - J.C.E.M. vol. 47, n. 3, pag. 665, 1978.
2. Brooks C.S. et al. - Renin activity in plasma of patients with normal renin and low renin essential hypertension - J.C.E.M., 44, 322, 1977.
3. Weinberger M.H. - The effect of posture and saline loading on plasma Renin activity and Aldosterone concentration in pregnant, non-pregnant and estrogen-treated women - J.C.E.M. 44, 69, 1977.
4. Speckart P. et al. - The effect of sodium restriction and prostaglandin inhibition on the renin-angiotensin system in man. - J.C.E.M. 44, 832, 1977.
5. Swales D. and Thurston H. - Plasma renin and Angiotensin II measurement in hypertensive and normal subjects: correlation of basal and stimulated states - J.C.E.M. 45, 159, 1978.
6. Re R.N. Sancho J. et al. - The characterization of low renin hypertension by plasma renin activity and plasma aldosterone concentration J.C.E.M. 46, 189, 1978.
7. Pallas K.G. et al. - The effect of conjugated estrogens on the renin-angiotensin system - J.C.E.M. 44, 1061, 1977.
8. F. Mantero et al. - Plasma renin activity and urinary aldosterone in acromegaly - J. Endocrinol. Invest 2, 13, 1979.
9. Hsueh W.A. et al. - Changes in active and inactive renin throughout pregnancy - J.C.E.M. 54, 1010, 1982.
10. Giovannelli G. et al. - Plasma renin activity (PRA) in the perinatal agefrom «Problems in pediatric endocrinology» - Ed. La Cauza-Root, Academic Press 1980.
11. Rollieri E. - Descrizione parametrica della curva dose-risposta nel metodo radioimmunologico e nelle tecniche Affini. Giorn. It. Clin. 2(1), 1-13-1977.
12. Rollieri E. et al. - Automatic treatment of Radioimmunoassay data - The Journal of Nuclear Biology and Medicine. Vol. 17, n. 3, pag. 128-141, 1973.
13. Sealey I.E. Plasma renin activity and plasma pro-renin assays. Clinical Chemistry Vol. 37 (10 Pt 2), pag. 1811-9/1991-10.
14. Plouin PF; Chatellier g.; Guyene TT; Vincent N; Corvol P. Recent advance in the clinical study of renin system. Reference values and conditions of validity. La Presse medicale: Vol. 18 (18); pag. 917-21/1989-05-06.

Physikalisches Daten of ¹²⁵I

Physical characteristics of ¹²⁵I

Caracteristicas fisicas ¹²⁵I

Caractéristiques physique de ¹²⁵I

Caratteristica fisica ¹²⁵I

Charakterystyka fizyczna ¹²⁵I

Физични характеристики на ¹²⁵I

$t_{1/2}$ = 59.9 Tagen, days, dias, jours, giorni, dni, дена

Wichtigste Emissionen

Main emissions

Emissiones principales

Emissions principales

Emissione principale

Średnie emisje

Основни лъчения

	E (MeV)	%
γ	0.035	
X	0.027	114
	0.032	25