



RENIN-IRMA

KIP1531

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version:
230123
New logo



en

Read entire protocol before use.

RENIN-IRMA

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name : DIAsource Renin-IRMA Kit
- B. Catalog number : KIP1531 : 96 tests
- C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

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

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

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

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

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

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

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

V. REAGENTS PROVIDED

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

Note: 1. Use the zero calibrator for sample dilution.

2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 2.2 +/- 0.2 μIU of NIBSC 68/356.

Values obtained in pg/ml must be multiplied by 2.2 to obtain results in $\mu\text{IU}/\text{ml}$ or mIU/l .

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

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

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Calibrators:** Reconstitute the calibrators with 2 ml distilled water
! For a complete solubilisation : after reconstitution, let the vials 30 min on a shaker, then vortex them.
- B. **Controls:** Reconstitute the controls with 2 ml distilled water.
- C. **Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 19 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (20x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

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

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

X. PROCEDURE

A. Handling notes

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

B. Procedure

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

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

XII. TYPICAL DATA

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

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

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

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

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

B. Specificity

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

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

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

C. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

Sample	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)
A	10	20.2 ± 1.7	8.5
B	10	67.7 ± 2.0	3.0

INTER-ASSAY PRECISION

Sample	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)
A	6	15.5 ± 1.7	11
B	6	59.3 ± 2.4	4

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST

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

Sample was diluted with zero calibrator

Value of undiluted sample : 1034 pg/ml

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

E. Hook effect

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

F. Reference Intervals

Normal range has been determined on EDTA plasma of 60 apparently healthy subjects, fasting, aged from 20 to 60:40 males and 20 females, without oestrogen-progesterone treatment and without treatment for hypertension. For each subject, two blood samples were taken: one after 1 hour of activity in an upright position and another after remaining in a supine position for one hour.

Range limits are fixed from 5 to 95 percentile

Upright 1.3 - 13.8 pg/ml

Supine 1.0 - 8.2 pg/ml

Each laboratory should establish its own normal range of values.

Be careful many factors can influence renin levels (age, posture, estrogen treatment, antihypertensive medication,...)

XIV. LIMITATIONS

- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits which employ mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays.
- Patients routinely exposed to animals or animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed in case of the presence of heterophilic antibodies. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies.
- If results are not consistent with other clinical observations, additional information should be required before diagnosis.

XV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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

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

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

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

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

XVIII SUMMARY OF THE PROTOCOL

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

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



fr

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

RENIN-IRMA

I. BUT DU DOSAGE

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

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

A. Nom du produit : DIAsource Renin-IRMA kit

B. Numéro de catalogue : KIP1531 : 96 tests

C. Fabriqué par : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

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

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

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

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

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

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

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

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

V. RÉACTIFS FOURNIS

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

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

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

VI. MATERIEL NON FOURNI

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

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

VII. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- A. Calibrateurs :** Reconstituer les calibrateurs avec 2 ml d'eau distillée.
! Pour une solubilisation complète : après reconstitution, laisser les flacons 30 minutes sur l'agitateur et ensuite les mélanger au vortex.
- B. Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 2 ml d'eau distillée.
- C. Solution de Lavage :** Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 19 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (20x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES RÉACTIFS

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

IX. PRÉPARATION ET STABILITÉ DE L'ÉCHANTILLON

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

X. MODE OPÉRATOIRE

A. Notes de manipulation

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

B. Mode opératoire

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

XI. CALCUL DES RÉSULTATS

- Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les cpm (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en Rénine (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, écarter les valeurs aberrantes.
- Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.

4. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNÉES TYPES

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

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

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

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Sensibilité

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

B. Spécificité

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

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

Échantillons testés	Valeur de la rénine (pg/ml)	+ 7,5 mg/ml d'Hb humaine (pg/ml)
1.	21,2	18,5
2.	57,1	50

Échantillons testés	Valeur de la rénine (pg/ml)	+0,2 mg/ml de bilirubine (pg/ml)
3.	2,6	20
4.	58,1	53,4

C. Précision

INTR-A-NALYSE PRÉCISION

échantillon	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{DS}$ (pg/ml)	CV (%)
A	10	20,2 ± 1,7	8,5
B	10	67,7 ± 2,0	3,0

INTER-NALYSE PRECISION

échantillon	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{DS}$ (pg/ml)	CV (%)
A	6	15,5 ± 1,7	11
B	6	59,3 ± 2,4	4

DS : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION

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

L'échantillon a été dilué avec le calibrateur zéro.

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

TEST DE RÉCUPÉRATION

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

E. Effet crochet

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

F. Valeurs Attendues

La fourchette des valeurs normales a été déterminée sur du plasma sur EDTA de 60 sujets apparemment sains, à jeun, âgés de 20 à 60 ans, 40 hommes et 20 femmes sans traitement oestrogénoprogestatif et sans traitement pour l'hypertension. Deux échantillons de sang ont été prélevés pour chacun des sujets: une après une heure d'activité en position debout et une autre après que le sujet soit resté allongé sur le dos pendant une heure.

Les limites de la fourchette ont été fixées entre les percentiles 5 et 95.

Debout 1,3 - 13,8 pg /ml

Allongé sur le dos 1,0 - 8,2 pg /ml

Chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

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

XIV. LIMITATIONS

- Les échantillons de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux de souris pour un diagnostic ou comme traitement peuvent contenir des anticorps humains anti-souris (HAMA). De tels échantillons peuvent montrer des valeurs soit faussement élevées soit faussement basses lorsqu'ils sont analysés avec des trousseaux d'analyses utilisant des anticorps monoclonaux de souris.
- Des anticorps hétérophiles dans le sérum humain peuvent réagir avec le réactif immunoglobulines, interférant ainsi avec les méthodes d'analyse immunologiques *in vitro*. Les patients couramment en contact avec des animaux ou des produits de sérum animal peuvent être sujets à ces interférences. Des valeurs anormales peuvent être observées en cas de présence d'anticorps hétérophiles. Évaluer soigneusement les résultats des patients suspectés d'avoir ces anticorps.
- Si les résultats ne sont pas cohérents avec les autres observations cliniques, des informations supplémentaires doivent être demandées avant de poser le diagnostic.

XV. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

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

XVI. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

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

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

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

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

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHIE

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

XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

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



de

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

Renin-IRMA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von aktives Renin in humanem EDTA Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

A. Handelsbezeichnung : DIAsource Renin-IRMA Kit

B. Katalognummer : KIP1531 : 96 Tests

C. Hergestellt von: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. KLINISCHER HINTERGRUND

Renin, ein Polypeptidenzym (MW ~40 000) (1), ist auch als Angiotensinogenase bekannt. Es handelt sich um eine Zirkuläre Protease, die von juxtaglomerulären Zellen im juxtaglomeralen Apparat der Nieren als Antwort auf geringes Blutvolumen oder niedrigen NaCl-Spiegel erzeugt wird.

Renin aktiviert das renin-angiotensin- System, indem es das in der Leber produzierte Angiotensinogen festhält und in Angiotensin I (inaktiv) umwandelt, welches dann im vaskulären Epithel der Lunge zu Angiotensin II (aktiv) umgewandelt wird. Angiotensin II kann Gefäßverengungen verursachen, indem es das Zentralnervensystem stimuliert. Zusätzlich wird die ADH- (antidiureisches Hormon) und Aldosteron- Sekretion der Nebenniere stimuliert. (6)

Die Regulierung des Blutdrucks und der renalen glomerulären Filtrationskontrolle (2) sind die wichtigsten Funktionen des Renin-Angiotensin-Systems.

Die plasmatische Konzentration des Renins wird durch die Konzentration des zirkulären Angiotensinogens und als Folge durch die Konzentration des Angiotensin II beeinflußt. Hohe Spiegel von Angiotensin II reduzieren die Renin Sekretion (negatives feedback).

Die Bestimmung der Renin-Plasma-Spiegel sind für die Diagnose von Hypertonie und bei der therapeutischen Nachverfolgung von Hochdruck Patienten sinnvoll. (3)

Die plasmatische Konzentration des Renins sinkt bei Patienten mit Hypertonie durch einen primären Hyperaldosteronismus (4) ab, im Gegensatz zur renovaskulären Hypertonie (5), bei der sowohl die Konzentrationen von Renin als auch von Aldosteron erhöht sind.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Der DiaSource Renin-IRMA ist ein Radioimmuno-Assay in beschichteten Röhrchen. Mabs1, die Fänger-Antikörper, haften an der unteren inneren Oberfläche des Plastikröhrechens. In die Röhrchen zugegebene Kalibratoren oder Proben zeigen zuerst eine niedrige Affinität zu Mabs1. Zugabe von Mab2, des mit ^{125}I markierten Signalantikörpers, vervollständigt das System und triggert die immunologische Reaktion. Nach dem Waschen gibt die verbleibende, an den Röhrchen haftende Radioaktivität die Antigenkonzentration wieder.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	Farb Code	Rekonstitution
Mit anti Renin- beschichtete Röhrchen (monoklonale Antikörper)	2 x 48	Schwarz	gebrauchsfertig
Ab ^{125}I TRACER: ^{125}I odmarkierter Anti-Renin (monoklonale Antikörper) in Phosphatpuffer mit Rinderserum und Azid (<0,1%)	1 Gefäß 10,5 ml 760 kBq	Rot	gebrauchsfertig
CAL N Kalibrator 0 - 6 in Humanplasma mit Thymol. Genaue Werte auf Gefäß-Etiketten.	7 Gefäße lyophil.	Gelb	2 ml dest. Wasser zugeben
WASH SOLN CONC Waschlösung (NaCl, Tween 20)	1 Gefäß 40 ml	Braun	20 x mit dest. Wasser verdünnen (Magnetrührer benutzen).
CONTROL N Kontrollen - N = 1 oder 2 Humanplasma mit Thymol	2 Gefäße lyophil.	Silber	2 ml dest. Wasser zugeben

Bemerkung: Benutzen Sie Null Kalibrator zur Probenverdünnung.
1 pg der Kalibratorzubereitung ist äquivalent zu $2,2 \pm 0,2 \mu\text{IU}$ NIBSC 68/356.
Als pg/ml erhaltene Werte müssen mit 2,2 multipliziert werden, um die Ergebnisse in $\mu\text{IU}/\text{ml}$ oder mIU/l zu erhalten.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, wird aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

- Dest. Wasser
- Pipetten: 100 μl , 300 μl und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Wegwerf-Plastikspitzen wird empfohlen)
- Plastikröhrechen für die Gesamtzählung
- Vortex Mixer
- Schüttler für Röhrchen (400 rpm)
- Magnetrührer
- 5 ml automatische Spritze (Cornwall Typ) zum Waschen
- Absaugsystem (optional)
- Jegl. Gamma-Counter, der ^{125}I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 2 ml dest. Wasser. ! Um totale Löslichkeit zu erreichen: lassen Sie die Röhrchen nach der Rekonstituierung 30 Min. auf einem Schüttler, dann vortexen.
- Kontrollen :** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 2 ml dest. Wasser.
- Waschlösung:** Bereiten Sie ein angemessenes Volumen Waschlösung aus einem Anteil Waschlösung (20x) mit 19 Anteilen dest. Wasser zu. Verwenden Sie einen Magnetrührer zum gleichmäßigen Durchmischen. Verwerfen Sie die nicht benutzte Waschlösung am Ende des Tages.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstitution sind die Reagenzien des Kits bis zum Ablaufdatum (Angaben auf Etikett) bei Lagerung bei 2°C bis 8°C stabil.
- Nach der Rekonstituierung sind die Kalibratoren und Kontrollen instabil. Benutzen Sie sie sofort nach der Lösung oder frieren Sie sie sofort portionsweise ein und bewahren Sie sie bei -20°C für maximal 6 Wochen auf. Sie sind nach einem Einfrier-Auftau-Zyklus stabil.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Frisch zubereitete Waschlösung sollte am selben Tag benutzt werden.
- Nach der ersten Benutzung ist der Tracer bei Aufbewahrung im Originalgefäß und bei 2° bis 8° C bis zum Ablaufdatum stabil.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können ein Anzeichen für Instabilität oder Zerfall sein.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Die Proben müssen EDTA-Plasma sein
- Falls der Test nicht innerhalb von 4 Std. durchgeführt wird, sollte das Plasma aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.
Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
Verwenden Sie saubere Wegwerf-Pipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Standardkurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Durchführung

- Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
- Vortexen Sie Kalibratoren, Proben und Kontrollen kurz und geben Sie jeweils 300 μl in ihre Röhrchen.
- Geben Sie 100 μl des mit ^{125}I markierten Anti-Renin in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
- Inkubieren Sie 180 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) außer Gesamtaktivität. Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie).
- Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
- Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Tragen Sie auf semilogarithmischem oder linearem Millimeterpapier den c.p.m. (Ordinate) für jeden Standard gegen die entsprechende Konzentration Renin (Abszisse) und zeichnen Sie eine Standardkurve durch die Standardpunkte, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Berechnen Sie die Konzentration für jede Kontrolle und Probe durch Interpolation aus der Standardkurve.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitstandardkurve verwendet werden.

Renin-IRMA		cpm	B/T (%)
Gesamtaktivität			100
Kalibrator	0 pg/ml	0 µIU/ml	152
	4 pg/ml	8,8 µIU/ml	579
	9 pg/ml	19,8 µIU/ml	984
	47 pg/ml	103,4 µIU/ml	3826
	95 pg/ml	209 µIU/ml	8161
	250 pg/ml	550 µIU/ml	20851
	520 pg/ml	1144 µIU/ml	55190
			17,73

1 pg der Kalibratorzubereitung ist äquivalent zu $2,2 \pm 0,2 \text{ µIU}$ NIBSC 68/356.

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwölf Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen. Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen über dem gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 0,78 pg/ml.

B. Spezifität

Die Kreuzreaktivität von Prorenin in diesem Renin IRMA Assay wurde durch die Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von Prorenin zu einer Plasmamatrix und der resultierenden Renin -Antwort bestimmt. Die Prorenin-Kreuzreaktion betrug 0,3%.

Die potentiell interferierenden Effekte von Hämoglobin bei 7,5 mg/ml und von Bilirubin bei 0,2 mg/ml wurden evaluiert. Die Ergebnisse dieser Tests (sehen Sie die Tabelle unten) zeigten ein Absinken der Plasmawerte um 10%. Die Vermeidung hämolyserter und Bilirubin enthaltender Proben wird gefordert.

getestete Probe	Renin gehalt (pg/ml)	+ Human Hb bei 7,5 mg/ml (pg/ml)
1.	21,2	18,5
2.	57,1	50
getestete Probe	Renin gehalt (pg/ml)	+Bilirubin bei 0,2 mg/ml (pg/ml)
3.	22,6	20
4.	58,1	53,4

C. Präzision

INTRA ASSAY

Serum	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD (pg/ml)}$	CV (%)
A	10	$20,2 \pm 1,7$	8,5%
B	10	$67,7 \pm 2,0$	3,0%

INTER ASSAY

Serum	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD (pg/ml)}$	CV (%)
A	6	$15,5 \pm 1,7$	11%
B	6	$59,3 \pm 2,4$	4%

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünn.	Theoret. Konzent. (pg/ml)	Gemess. Konzent. (pg/ml)
	1/4	258,6	
	1/8	129,3	125,5
	1/16	64,6	62,3
	1/32	32,3	29,4
	1/64	16,1	14,2
	1/128	8	6,7

Die Proben wurden mit Null Kalibrator verdünnt.
Wert der unverdünnten Probe: 1034 pg/ml.

WIEDERFINDUNGSTEST

Zugeg. Renin (pg/ml)	Wiedergef. Renin (pg/ml)	Wiedergefunden (%)
11,8	10,5	89
24,2	21,4	88
57	53	93
117	96	82

E. Hookeffekt

Eine Probe mit Renin bis zu 90 000 pg/ml liefert höhere Messwerte als der letzte Kalibratormeßwert.

F. Referenz Intervalle

Der Normalbereich wurde mit EDTA Plasma von 60 offensichtlich gesunden fastenden Individuen im Alter von 20 bis 60 bestimmt: bei 40 Männern und 20 Frauen, ohne Östrogen-Progesteron-Behandlung und ohne Behandlung auf Hypertension (Bluthochdruck). Es wurden pro Person jeweils zwei Blutproben entnommen: eine nach 1 Stunde Aktivität in aufrechter Position und die zweite nach 1 Stunde in Rückenlage. Die Bereichsgrenzen wurden festgelegt von 5 bis 95 Perzentil

Aufrecht 1,3 – 13,8 pg/ml

Rückenlage 1,0 – 8,2 pg/ml

Jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Achtung: viele Faktoren können die Renin-Spiegel beeinflussen (Alter, geistige Einstellung, Östrogenbehandlung, blutdrucksenkende Medikamente, ...)

XIV. ANWENDUNGSGRENZEN

- Proben von Patienten, die Zubereitungen von monoklonalen Maus-Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder zu niedrige Werte ergeben, wenn sie mit Testsystemen getestet werden, die monoklonale Maus Antikörper enthalten.

- Heterophile Antikörper im humanen Serum können mit Immunglobulinen der Reagenzien reagieren und so mit in vitro Immunoassays interferieren.

Patienten, die routinemäßig Umgang mit Tieren oder Tierseren haben, können zu dieser Interferenz neigen und so können anormale Werte in Gegenwart von heterophilen Antikörpern beobachtet werden. Ergebnisse von Patienten, bei denen diese Antikörper vermutet werden, müssen sorgfältig evaluiert werden.

Wenn die Ergebnisse nicht mit anderen klinischen Beobachtungen übereinstimmen, sollten weitere Informationen vor der Diagnosestellung ermittelt werden.

XV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.

- 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.

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ^{125}I (Halbwertzeit: 60 Tagen) , das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausstattung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAG, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien oder Serumproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde.

Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiös betrachtet werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschriften den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

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

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT (μl)	KALIBRATOREN KONTROLLEN (μl)	PROBE(N) (μl)
Inkubation Kalibratoren (0-6) Proben, Kontrollen	-	300 -	- 300
Tracer	100	100	100
Inkubation	180 Min. bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln (400 rpm).		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung Trennung	- - - - -	absaugen (oder dekant.) 2 ml absaugen (oder dekant.) 2 ml absaugen (oder dekant.)	
Gamma Counter	60 Sekunden messen		



it

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

RENIN-IRMA

I. USO DEL KIT

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

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

A. Nome commerciale: DIAsource Renin-IRMA Kit

B. Numero di catalogo: KIP1531: 96 tests

C. Prodotto da: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

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

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

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

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

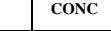
La determinazione dei livelli plasmatici di renina è utile nelle diagnosi di ipertensione e nel follow up terapeutico del paziente iperteso (3).

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

IV. PRINCIPIO DEL METODO

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

V. REATTIVI FORNITI

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

Note: Usare il Calibratore zero per diluire i campioni.

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

I Valori ottenuti in pg/ml devono essere moltiplicati per 2,2 per ottenere risultati in $\mu\text{IU}/\text{ml}$ o mIU/l .

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

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

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

A. **Calibratori** Ricostituire i calibratori con 2,0 ml di acqua distillata.

Per una solubilizzazione completa: dopo ricostituzione, porre i flaconi su agitatore per 30 minuti e poi su vortex.

B. **Controlli:** Ricostituire i controlli con 2,0 ml di acqua distillata.

C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 19 parti di acqua distillata a una parte di tampone di lavaggio concentrato (20 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

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

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

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

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.

Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.

Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.

Per evitare contaminazioni incrociate, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usa un nuovo reattivo o campione.

L'uso di pipette ben tarate e ad alta precisione o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.

Rispettare i tempi di incubazione.

Allestire una curva di taratura per ogni sessione analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sessioni analitiche precedenti.

B. Metodo del dosaggio

- Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplice ogni standard, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
- Agitare brevemente su vortex lo standard, i campioni e i controlli. Dispensare 300 μl di standard, campioni e controlli nelle rispettive provette.
- Distribuire 100 μl di anti-Renina marcati con ^{125}I in ogni provetta, comprese quelle non pre-adsorbite per l'attività totale.
- Incubare 180 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione (400 rpm).
- Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
- Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
- Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
- Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
- Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- Calcolare la media delle determinazioni in duplice.
- Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie delle conte per minuto (cpm) di ogni standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di Renina. Scartare i duplicati palesemente discordanti.
- Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
- È possibile utilizzare un sistema automatico di interpolazione dati. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

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

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

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

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

B. Specificità

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

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

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

C. Precisione

INTRA-SAGGIO

Campione	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{DS}$ (pg/ml)	CV (%)
A	10	$20,2 \pm 1,7$	8,5
B	10	$67,7 \pm 2,0$	3,0

INTER-SAGGIO

Campione	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{DS}$ (pg/ml)	CV (%)
A	6	$15,5 \pm 1,7$	11
B	6	$59,3 \pm 2,4$	4

DS: Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

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

I campioni sono stati diluiti con il calibratore zero.

Valori del campione puro: 1034 pg/ml.

RECOVERY TEST

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

E. Effetto hook

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

F. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

L'intervallo normale è stato determinato su plasma in EDTA prelevato da 60 soggetti apparentemente sani, a digiuno, di età compresa tra 20 e 60 anni, di cui 40 soggetti di sesso maschile e 20 soggetti di sesso femminile, non in terapia con estrogeni-progesterone né in terapia con antipertensivi. A ogni soggetto sono stati prelevati due campioni di sangue: il primo dopo 1 ora di attività in posizione eretta e il secondo dopo 1 ora di permanenza a riposo in posizione coricata. Sono stati stabiliti quindi i limiti dell'intervallo dal 5° al 95° percentile:

posizione eretta 1,3 – 13,8 pg /ml
posizione supina 1,0 – 8,2 pg /ml

Ciascun laboratorio deve stabilire il proprio range di normalità.

Da tenere presente che i livelli di renina possono essere influenzati da diversi fattori (età, postura, terapia estrogenica, farmaci antipertensivi...)

XIV. LIMITAZIONI

Campioni di pazienti che abbiano assunto preparazioni a base di anticorpi monoclonali murini a scopo diagnostico o terapeutico potrebbero contenere anticorpi umani antimurini (HAMA). Tali campioni, quando testati con metodiche basate sull'impiego di anticorpi monoclonali murini, potrebbero produrre valori falsamente elevati o ridotti.

Nell'esecuzione di tecniche di immunodosaggio in vitro, la presenza in campioni di siero umano di anticorpi eterofili che possono reagire con immunoglobuline reattive può dar luogo ad interferenze.

Pazienti sistematicamente esposti al contatto con animali o con prodotti derivanti da siero animale possono essere oggetto di tale tipo di interferenza, con conseguente riscontro di risultati anomali in caso di presenza di anticorpi eterofili. Si raccomanda pertanto di valutare attentamente i risultati relativi ai pazienti con sospetta presenza di tale tipo di anticorpo.

Qualora i risultati non fossero in linea con le altre osservazioni cliniche si renderà necessaria la raccolta di ulteriori informazioni prima della formulazione di una diagnosi.

XV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

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

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ^{125}I (emivita: 60 giorni) che emette raggi X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in appositi contenitori in locali preposti che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria devono essere destinati all'uso di isotopi specifici per evitare contaminazioni incrociate.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni o siero secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

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

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

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

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

RENIN-IRMA

I. INSTRUCCIONES DE USO

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre: DIAsource Renin-IRMA Kit
- B. Número de Catálogo: KIP1531 : 96 tests
- C. Fabricado por: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar:
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

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

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

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

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

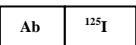
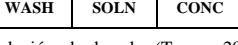
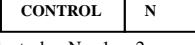
La determinación de los niveles plasmáticos de renina es útil en el diagnóstico de hipertensión y en el seguimiento terapéutico de los pacientes hipertensos (3).

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

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

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

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	96 test Kit	Código de Color	Reconstitución
 Tubos recubiertos con anticuerpo Renina (anticuerpo monoclonal)	2 x 48	negro	Listo para uso
 Anti-Renin- ^{125}I (anticuerpo monoclonal) en tampón fosfato con plasma bovino, azida (<0,1%)	1 vial 10,5 ml 760 kBq	rojo	Listo para uso
 Calibradores 0-6 en plasma humano y thymol (mirar los valores exactos en las etiquetas)	7 viales liofilizados	amarillo	Añadir 2,0 ml de agua destilada
 Solución de lavado (Tween 20-NaCl)	1 vial 40 ml	marrón	Diluir 20 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
 Controls - N = 1 or 2 en plasma humano y thymol	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 2,0 ml de agua destilada

Nota: 1. Use el calibrador cero para diluir muestras.

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

Los valores obtenidos en pg/ml deben ser multiplicados por 2,2 para obtener resultados en $\mu\text{IU}/\text{ml}$ o mIU/l.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Pipetas de 100 μl , 300 μl and 2 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Tubos plásticos para recuento total
4. Vortex
5. Agitador de tubos (400rpm)
6. Agitador magnético
7. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
8. Sistema de aspiración (opcional)
9. Contador de radiaciones gamma para medir I^{125} (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A. Calibradores: Reconstituya el calibrador con 2,0 ml de agua destilada.

! Para una disolución total : después de reconstituir, deje el vial 30 min en un agitador, luego en un agitador vórtice.

B. Controles: Reconstituya los controles con 2,0 ml de agua destilada.

C. Solución de lavado de trabajo: Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 19 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (20x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

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

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

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

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

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

B. Protocolo

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

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

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

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

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

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

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

a. Límite de detección

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

b. Especificidad

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

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

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

c. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO

Muestra	N	$\text{CV} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	CV (%)
A	10	20,2 ± 1,7	8,5
B	10	67,7 ± 2,0	3,0

PRECISIÓN INTER-ENSAYO

Muestra	N	$\text{CV} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	CV (%)
A	6	15,5 ± 1,7	11
B	6	59,3 ± 2,4	4

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

d. Exactitud

TEST DILUCIÓN

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

Las muestras fueron diluidas con calibrador cero

Valor de la muestra sin diluir: 1034 pg

TEST DE RECUPERACIÓN

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

e. Efecto de gancho

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

f. INTERVALOS DE REFERENCIA

El rango normal se a determinado en plasma EDTA de 60 sujetos aparentemente sanos, en ayunas de edades entre 20 y 40 años: 40 hombres y 20 mujeres sin tratamiento de estrógeno-progesterona y sin tratamiento para la hipertensión. Se tomaron dos muestras de sangre de cada sujeto después de 1 hora de actividad realizada de pie y otra permaneciendo tumbado durante una hora.

Los límites del ámbito de medición se han fijado entre los percentiles 5 y 95.

De pie 1,3 – 13,8 pg /ml
Tumbado 1,0 – 8,2 pg /ml

Cada laboratorio debe establecer sus propios valores de rango normal.

Tenga cuidado, muchos factores pueden influenciar los niveles de renina (edad, postura, tratamiento con estrógeno, medicamentos antihipertensivos,...)

XIV. LIMITACIONES

- Es posible que las muestras de pacientes que han recibido preparaciones de anticuerpos monoclonales de ratón para diagnóstico o terapia, puedan contener anticuerpos humanos anti ratón (HAMA). Los resultados de estas muestras analizadas con kits que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón, pueden dar valores falsamente aumentados o disminuidos.
- Los anticuerpos heterófilos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas que forman parte del reactivo, interfiriendo con los immunoensayos in vitro. Pacientes que en forma rutinaria están en contacto con animales o productos derivados de suero animal, pueden tender a presentar esta interferencia y se pueden observar valores anómalos en caso de haber presencia de anticuerpos heterófilos. Evalúe cuidadosamente los resultados de aquellos pacientes sospechosos de tener estos anticuerpos. Si los resultados no concuerdan con otras observaciones clínicas, será necesario obtener información adicional antes de hacer un diagnóstico.

XV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35,5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes contenido substancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetejar con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

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

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

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

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

RENIN-IRMA

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Kit de ensaio imunoradiométrico para determinação quantitativa in vitro de Renina ativa no plasma EDTA humano.

II. INFORMAÇÃO GERAL

A. Nome do proprietário : DIAsource Renin-IRMA Kit

B. Nº de catálogo : KIP1531 : 96 testes

C. Produzido por : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para assistência técnica ou encomendas contacte :

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. FUNDAMENTAÇÃO CLÍNICA

A Renina é uma enzima polipeptídica (MW ~ 40000) (1), também conhecida como angiotensinogenase, é uma protease secretada por células circulantes justaglomerulares do aparelho justaglomerular do rim em resposta ao baixo volume de sangue ou de baixo teor de NaCl do corpo.

Renina ativa o sistema renina-angiotensina através da clivagem de angiotensinogénio, produzido no fígado, em angiotensina I (inativo) o que é ainda melhor convertido em angiotensina II (ativa) no epitélio vascular do pulmão. A angiotensina II pode causar vasoconstrição, estimulando o sistema nervoso central, em adição ele estimula a secreção de ADH (hormônio antidiurético) e a secreção de aldosterona a partir da glândula supra-renal (6).

A regulação da pressão sanguínea e de controle de filtração glomerular renal (2) são as mais importantes funções do sistema renina-angiotensina.

A concentração plasmática de renina é influenciada pela concentração circulante de angiotensinogénio e, subsequentemente, a concentração de angiotensina II. Altos níveis plasmáticos de angiotensina II reduzem a secreção de renina. (Feed back negativo)

A determinação dos níveis de renina no plasma é útil no diagnóstico da hipertensão e no acompanhamento terapêutico de pacientes hipertensos (3).

Concentração plasmática de renina diminui em pacientes com hipertensão devido a um hiperaldosteronismo primário (4) Ao contrário da hipertensão renovascular (5), onde as concentrações de renina e aldosterona são ambas elevadas.

IV. PRINCIPIOS DO MÉTODO

O DIAsource Renin-Irma é um ensaio imunoradiométrico baseado na separação em tubo revestido. Mab1, anticorpo de captura, está ligado à superfície inferior e interior do tubo de plástico. Os calibradores ou amostras adicionados aos tubos vão inicialmente, demonstrar baixa afinidade para o Mabs1. A adição do Mab2, O anticorpo sinal , marcado com ^{125}I , vai completar o sistema e despoletar a reacção imunológica. Depois da lavagem, a actividade radioactiva remanescente ligada ao tubo, reflecte a concentração de antígeno.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 testes	Código de cor	Reconstituição
Tubos revestidos com anti Renin (Acs monoclonais)	2 x 48	Preto	Pronto a utilizar
Ab ^{125}I	1 vial 10,5 ml 760 kBq	vermelho	Pronto a utilizar
Anti-Renin ^{125}I (Acs monoclonais) em tampão fosfato com soro bovino e azida (<0.1%)			
CAL N	7 viales liofilizados	amarelo	Adicione 2 ml de água destilada
Calibradores 0-6 em plasma humano e timol. Ver valores exactos nos rótulos dos recipiente			
WASH SOLN CONC	1 vial 40 ml	marrom	Dilua 20 x com água destilada (use um agitador magnético).
Solução de lavagem (Tween 20-NaCl)			
CONTROL N	2 viais liofilizados	prateado	Adicione 2 ml de água destilada
Controlos - N = 1 or 2 em plasma humano e timol.			

Note: 1. Use o Calibrador Zero para diluições da Amostra.

2. 1 pg do calibrador preparado é equivalente para 2,2 +/- 0,2 μIU de NIBSC 68/356.

Valores obtidos em pg/ml devem ser multiplicados por 2,2 para obter resultados em $\mu\text{IU}/\text{ml}$ ou mIU/l .

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

O seguinte material é necessário, mas não fornecido com o kit:

- Água destilada
- Pipetas automáticas de: 100 μl , 300 μl e 2 ml (recomenda-se o uso de pipetas adequadas com pontas descartáveis)
- Tubos plásticos para contagens totais
- Misturador vortex
- Agitador de tubos (400 rpm)
- Agitador magnético
- Seringa automática de 5 ml (tipo Cornwall) para lavagem
- Sistema de aspiração (opcional)
- Qualquer contador gama com capacidade para medir ^{125}I pode ser utilizado (alcance mínimo 70%).

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- A. Calibradores:** Reconstituição dos calibradores com 2 ml de água destilada
! Para a solubilização completa: após a reconstituição, deixar os frascos 30 min em um agitador, então vortexizar.
- B. Controlos :** Reconstitua os controlos com 2 ml de água destilada.
- C. Solução de Lavagem de Trabalho:** Prepare um volume adequado de Solução de Lavagem de Trabalho ao adicionar 19 volumes de água destilada a 1 volume de solução de lavagem (20x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Rejeite a solução de lavagem não utilizada no final do dia.

VIII. CONSERVAÇÃO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de serem abertos ou reconstituídos todos os componentes do kit são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo, desde que mantidos entre 2-8°C.
- Após a reconstituição, os calibradores e controlos são instáveis, usá-los imediatamente após a reconstituição, congelá-los e mantê-los em alíquotas a -20 ° C por até 6 semanas. Eles são estáveis após um ciclo de congelação-descongelamento.
- Evite ciclos de congelação e descongelamento.
- A Solução de Lavagem de Trabalho recentemente preparada deve ser utilizada no mesmo dia.
- Após a 1ª utilização, o marcador é estável até ao final do prazo de validade, desde que mantido no recipiente original bem fechado, entre 2 a 8°C
- As alterações na aparência física dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- As amostras devem ser plasma EDTA.
- Se o teste não for executado dentro de 4 h, o plasma deve ser aliquotado e armazenado a -20 ° C.
- Evite ciclos subsequentes de congelação e descongelamento

X. PROCEDIMENTO

A. Notas de manipulação

Não utilize o kit ou os seus componentes após a expiração do prazo de validade.
 Não misture componentes de lotes diferentes.
 Antes de utilizar todos os reagentes devem estar à temp. ambiente.
 Misture completamente os reagentes e as amostras com agitação ou rotação suaves.
 Para evitar contaminações cruzadas, use uma pipeta com ponta descartável para a adição de cada reagente e amostra. As pipetas de precisão elevada ou a pipetagem automática vão aumentar a precisão.
 Respeite os tempos de incubação.
 Prepare uma curva padrão para cada análise e não utilize dados de análises anteriores.

B. Procedimento

- Roule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra e controlo. Para a determinação de contagens totais, marque 2 tubos normais.
- Misture por breves momentos, no misturador vortex calibradores, controlos, amostras e dispense 300 μl de cada para os tubos respectivos.
- Dispense 100 μl de anti Renina ^{125}I Iodine marcada dentro de cada tubo. Incluindo os tubos não revestidos para contagem total
- Incube durante 120 minutos à temp. ambiente com agitação contínua (400 rpm).
- Aspire (ou decante) o conteúdo de cada tubo (excepto as contagens totais). Certifique-se que a ponta de plástico do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remoção de todo o líquido.
- Lave os tubos com 2 ml de Solução de Lavagem de Trabalho (excepto as contagens totais) e aspire (ou decante). Evite a formação de espuma durante a adição de Solução de Lavagem de Trabalho
- Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 mL di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
- Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
- Conte os tubos no contador gama durante 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

- Calcule a média das determinações em duplicado.
- Em log-log, papel semilogarítmico ou de gráfico linear desenhe o c.p.m. (ordenadas para cada padrão contra a concentração correspondente de OST (abcissas) e desenhe uma curva padrão (de calibração) através dos pontos padrão e rejeite os pontos marginais (outliers) óbvios.
- Leia a concentração para cada controlo e amostra por interpolação na curva de calibração.
- A redução dos dados através de computador simplificará estes cálculos. Se o processamento dos resultados for automático, é recomendado um ajustamento de curvas de função logística de 4 parâmetros.

XII. DADOS TÍPICOS

Os dados seguintes servem apenas como exemplo e nunca devem ser utilizados em vez da curva de calibração executada em tempo real.

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

1 pg de calibrador preparado é equivalente a 2,2 +/- 0,2 µIU ou NIBSC 68/356

XIII. DESEMPENHO E LIMITAÇÕES

A. Limite da detecção

Foram analisados 12 calibradores zero juntamente com outros calibradores. O limite de detecção, definido como a concentração aparente 2 desvio padrão acima da média de contagem com 0 ligações foi de 0,78 pg/ml.

B. Especificidade

A reatividade cruzada, da pro-renina neste ensaio Renina IRMA foi determinada pela adição de várias concentrações de pró-renina para uma matriz de plasma e medindo a resposta da Renina aparente. A reatividade cruzada da Prorenina encontrada foi de 0,3%.

Os efeitos potencialmente interferentes de hemoglobina a 7,5 mg/ml e da bilirrubina a 0,2 mg/ml, foram avaliados. Os resultados deste teste (ver a tabela abaixo) mostram uma diminuição de aproximadamente 10% dos valores do plasma. A recomendação é evitar amostras hemolizada e amostras contendo bilirrubina.

Amostra testada	Valor Renina (pg/ml)	+ Hb Humana a 7,5 mg/ml (pg/ml)
1.	21,2	18,5
2.	57,1	50
Amostra testada	Valor Renina (pg/ml)	+ bilirrubina a 0,2 mg/ml (pg/ml)
3..	22,6	20
4.	58,1	53,4

C. Precisão

INTRA-ENSAIO PRECISÃO

Amostra	N	$\langle X \rangle \pm DP$ (pg/ml)	CV (%)
A	10	20,2 ± 1,7	8,5
B	10	67,7 ± 2,0	3,0

INTER-ENSAIO PRECISÃO

Amostra	N	$\langle X \rangle \pm DP$ (pg/ml)	CV (%)
A	6	15,5 ± 1,7	11
B	6	59,3 ± 2,4	4

DP : Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Exactidão

TESTE DE DILUIÇÃO

Amostra	Diluição	Conc. teórico. (pg/ml)	Conc. medida (pg/ml)
	1/4	258,6	
	1/8	129,3	125,5
	1/16	64,6	62,3
	1/32	32,3	29,4
	1/64	16,1	14,2
	1/128	8	6,7

As amostras foram diluídas com Calibrador Zero.

Valores de amostras sem diluição : 1034 pg/ml

TESTE DE RECUPERAÇÃO

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

E. Efeito "Hook"

Uma amostra enriquecida com renina humana até 90 000 pg/ml dá um sinal acima da concentração calibrador mais elevada do calibrador.

F. Intervalos de Referência

O intervalo normal foi determinado com plasma EDTA de 60 indivíduos aparentemente saudáveis, em jejum, com idades de 20 a 60 anos: 40 homens e 20 mulheres, sem tratamento com estrogênio-progesterona e sem tratamento para a hipertensão. Para cada paciente, foram tiradas duas amostras de sangue: uma após 1 hora de atividade em uma posição ereta e outra depois de permanecer em posição decúbito dorsal durante uma hora. Limites de intervalo são fixados de 5 a 95 percentil

Ereta 1,3-13,8 pg / ml
Decúbito Dorsal 1,0-8,2 pg / ml

Cada laboratório deve estabelecer seus próprio intervalo de valores. Tenha cuidado pois muitos fatores podem influenciar os níveis de renina (idade, postura, uso de estrógenos, medicação anti-hipertensiva, ...)

XIV. LIMITAÇÕES

- Amostras de pacientes que receberam preparações de anticorpos monoclonais de camundongos para diagnóstico ou terapia podem conter anticorpos humanos anti-camundongos (HAMA). Essas amostras podem apresentar tanto valores falsamente elevados ou diminuídos quando testado com kits de teste que utilizam anticorpos monoclonais de camundongos.
- Anticorpos heterofílicos no soro humano podem reagir com o reagente de imunoglobulinas, interferindo com os imunoensaios.
- Os pacientes rotineiramente expostos a animais ou produtos de soro animal podem estar propensos a esse tipo de interferência e valores anômalos podem ser observados no caso da presença de anticorpos heterofílicos. Avaliar cuidadosamente os resultados de pacientes com suspeita de ter esses anticorpos.
- Se os resultados não forem consistentes com outras observações clínicas, informação adicional deve ser exigida antes do diagnóstico.

XV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o Controlo 1 e/ou 2 não se situarem dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser usados, sem que haja uma explicação satisfatória para a discrepância verificada.
- Se tal for desejável, cada laboratório pode fazer os seus pools de amostras de controlo, que devem ser mantidas na forma de alíquotas congeladas.
- Os critérios de aceitação para a diferença entre os resultados duplos das amostras devem basear-se nas Boas Práticas Laboratoriais.

XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança

Para utilização em diagnóstico in vitro.

Este kit contém ^{125}I (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizantes.

Este produto radioativo pode ser transferido para e utilizado apenas por pessoas autorizadas; a aquisição, conservação, uso e troca de produtos radioactivos está sujeita a legislação nacional. Em caso algum este produto poderá ser administrado a seres humanos ou a animais.

Toda a manipulação de material radioativo deve ser executado em área própria longe de locais de passagem. Deve ser mantido no laboratório um livro de notas (log book) para a recepção e conservação dos materiais radioactivos. O equipamento de laboratório contaminado e as substâncias perigosas devem ser eliminadas e separadas para evitar contaminação por diferentes isótopos.

Quaisquer derrames de material radioativo devem ser imediatamente limpos de acordo com os procedimentos de rádio-segurança. O lixo radioativo deve ser descartado de acordo com a legislação local e com as directrizes vigentes. A adesão às regras básicas de segurança com material radioativo confere a proteção adequada.

O material de origem humana utilizado na preparação do reagente foi testado e considerado não reactivo ao antigénio de superfície da Hepatite B (HBs Ag), aos anticorpos do vírus da Hepatite C (HCV) e aos anticorpos do vírus da Imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2). Dado que nenhum método de ensaio conhecido pode oferecer a segurança completa da ausência de agentes infecciosos, manusear os reagentes e as amostras dos doentes como potencialmente infecciosos. Todos os produtos animais e derivados foram recolhidos a partir de animais saudáveis Os componentes bovinos são oriundos de países onde não foram notificados casos de BSE. No entanto os componentes com substâncias animais devem ser tratados como potencialmente infecciosos.

Evitar contacto com a pele, olhos e mucosas (azida sódica como conservante). A azida sódica pode reagir com as canalizações de chumbo ou cobre formando azidas metálicas altamente explosivas. Portanto, deixar fluir água em abundância nos tubos durante a eliminação de líquidos para prevenir a acumulação de azidas. Não fume, beba, coma ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não pipete pela boca. Use vestuário de protecção e luvas descartáveis.

XVII. BIBLIOGRAFIA

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

XVIII RESUMO DO PROTOCOLO

	CONTAGENS TOTALS μ l	CALIBRADORES CONTROLOS μ l	AMOSTRA(S) μ l
INCUBAÇÃO Calibradores (0-6), Controlos Amostras	- -	300 -	- 300
Marcador	100	100	100
Incubação	180 minutos a temperantura ambiente com agitação de 400 rpm		
Separação Solução de Lavagem de Trabalho Separação Solução de Lavagem de Trabalho Separação	-	Aspire (ou decante) 2 ml Aspire (ou decante) 2 ml Aspire (ou decante)	
Contegem	Conte os tubos durante 60 seg		

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

RENIN-IRMA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

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

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία: Renin-IRMA της DiaSource
B. Αριθμός καταλόγου: KIP1531 : 96 προσδιορισμοί
Γ. Κατασκευάζεται από την: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

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

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

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

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

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

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

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με Αντι-ρενίνη (μονοκλωνικό αντίσωμα)	2 x 48	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
Μονοκλωνικά αντισώματα αντι-ρενίνης σημασμένα με ^{125}I ιωδίνη σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα με βόρειο ορό, αξιόδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 10,5 ml 760 kBq	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
Βαθμονομητές N = 0 έως 6 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων)	7 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού
Διάλυμα πλύσης (NaCl, Tween 20)	1 φιαλίδιο 40 ml	καφέ	Αραιώστε 20 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	ασημί	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού

- Σημείωση:** 1. Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.
2. 1 pg του παρασκευάσματος βαθμονομητή αντιστοιχεί σε 2,2 +/- 0,2 μIU του NIBSC 68/356.

Οι τιμές που λαμβάνονται σε pg/ml πρέπει να πολλαπλασιάζονται επί 2,2 για τη λήψη αποτελεσμάτων σε μIU/ml ή mIU/l.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

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

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 2,0 ml απεσταγμένου νερού.
! Για πλήρη διαλυτότητα : Μετά την ανασύσταση αφήστε τα φιαλίδια για 30 λεπτά σε δονητή και κατόπιν αναδεύστε ξανά σε αναδευτήρα vortex.
B. Οροί ελέγχου: Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 2,0 ml απεσταγμένου νερού.

Γ. Πλήνυμα πλύσης εργασίας: Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 19 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (20x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

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

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

X. ΛΙΔΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

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

B. Διαδικασία

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

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις c.p.m. (κρούσεις ανά λεπτό) (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της ρενίνης (τετμημένη) και σχεδιάστε μια

καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, απορρίψετε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.

3. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
4. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΛΕΛΟΜΕΝΑ

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

Renin-IRMA		ερμ	B/T (%)
Κρούσεις του ^{125}I ("total")			100
Βαθμονομητής	0 pg/ml	0 $\mu\text{IU}/\text{ml}$	152
	4 pg/ml	8,8 $\mu\text{IU}/\text{ml}$	579
	9 pg/ml	19,8 $\mu\text{IU}/\text{ml}$	984
	47 pg/ml	103,4 $\mu\text{IU}/\text{ml}$	3826
	95 pg/ml	209 $\mu\text{IU}/\text{ml}$	8161
	250 pg/ml	550 $\mu\text{IU}/\text{ml}$	20851
	520 pg/ml	1144 $\mu\text{IU}/\text{ml}$	55190
			17,73

1 pg του παρασκευάσματος βαθμονομητή αντιστοιχεί σε $2,2 \pm 0,2 \mu\text{IU}$ του NIBSC 68/356.

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίγνενσης

Μετρήθηκαν δώδεκα μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ομάδα των άλλων βαθμονομητών.

Το όριο ανίγνενσης, ορίζομενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,78 pg/ml.

B. Ειδικότητα

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

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

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

C. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

Δείγμα	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{T.A. (pg/ml)}$	Σ.Δ. (%)
A	10	$20,2 \pm 1,7$	8,5
B	10	$67,7 \pm 2,0$	3,0

ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Δείγμα	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{T.A. (pg/ml)}$	Σ.Δ. (%)
A	6	$15,5 \pm 1,7$	11
B	6	$59,3 \pm 2,4$	4

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

D. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

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

Το δείγμα αραιώθηκε με το μηδενικό βαθμονομητή.

Τιμή του μη αραιωμένου δείγματος : 1034 pg/ml

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

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

E. Φαινόμενο αγκίστρου (hook)

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

F. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Το φυσιολογικό εύρος καθορίστηκε σε πλάσμα EDTA 60 εμφανώς υγιών, νήστεων υποκειμένων, ηλικίας 20 έως 60 ετών: 40 άνδρες και 20 γυναίκες, χωρίς θεραπεία οιστρογόνων-προγεστερόνης και χωρίς θεραπεία υπέρτασης. Για κάθε υποκείμενο λήφθηκαν δύο δείγματα αίματος: ένα μετά από 1 ώρα δραστηρότητας σε όρθια θέση και άλλο ένα μετά από παραμονή σε ύπνια θέση για μία ώρα.

Τα όρια ευρόν είναι σταθεροποιημένα μεταξύ 5^ο και 95^ο εκατοστημόριου

Όρθια θέση 1,3 – 13,8 pg/ml

Ύπνια θέση 1,0 – 8,2 pg/ml

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

XIV. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- Δείγματα από ασθενείς που έχουν λάβει παρασκευάσματα μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικού για σκοπούς διάγνωσης ή θεραπείας, ενδεχομένως να περιέχουν ανθρώπινα αντισώματα αντί-ποντικού (HAMA). Σε αυτά τα δείγματα μπορούν να παρατηρηθούν ψευδών αυξημένες ή ψευδών μειωμένες τιμές, σταν ελέγχουν με κίτ προσδιορισμού που χρησιμοποιούν μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού.
- Τα ετεροφιλικά αντισώματα στον ανθρώπινο ορό μπορούν να αντιδράσουν με ανοσοσφαρίνες των αντιδραστηρίων, προκαλώντας παρεμβολή σε *in vitro* ανοσοπροσδιορισμούς. Ασθενείς που εκτίθενται τακτικά σε ζώα ή προϊόντα ζωικού ορού ενδεχομένως να είναι επιρρεπείς σε αυτήν την παρεμβολή. Παθολογικές τιμές μπορούν να παρατηρηθούν σε παρουσία ετεροφιλικών αντισωμάτων. Αξιολογείται με προσοχή τα αποτελέσματα ασθενών, στους οποίους υπάρχει υποψία αυτών των αντισωμάτων. Εάν τα αποτελέσματα δεν είναι σύμφωνα με άλλες κλινικές παρατηρήσεις, θα χρειαστεί η λήψη περαιτέρω πληροφοριών πριν από τη θέση της διάγνωσης.

XV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

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

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Το κιτ αυτό περιέχει το ^{125}I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV).

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

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

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

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντί-HCV, αντί-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε μεταδόσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων ή δειγμάτων ορού θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

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

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

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

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



ru

Тщательно ознакомиться перед пользованием.

RENIN-IRMA

I. ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Комплект количественного радиоиммунного анализа для *in vitro* количественных измерений ренина в человеческой плазме ЭДТА.

II. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентованное название:** DIAsource Renin-IRMA Kit
 - B. Номер по каталогу:** KIP1531 : 96 тестов
 - C. Изготовитель:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

**За технической консультацией или по оформлению заказа обращаться:
Тел: +32 (0)10 84.99.11 Факс: +32 (0)10 84.99.91**

III. КЛИНИЧЕСКАЯ КАРТИНА

Ренин - полипептидный энзим (м.м.~ 40000) (1), также известный как ангиотензиногенез, является протеолитическим ферментом, выделяемым юкстагломерулярными клетками юкстагломерулярного почечного комплекса как ответная реакция на низкий объем крови или низкое содержание NaCl в организме.

Ренин активизирует ренин-ангиотензиновую систему за счет расщепления гипертензиногена, продуцируемого в печени, на ангиотензин I (неактивный), который, в свою очередь, преобразуется в ангиотензин II (активный) в сосудистом эпителии легких. Ангиотензин II способен вызывать сужение кровеносных сосудов за счет стимуляции центральной нервной системы. Кроме того, он стимулирует выделение АДГ (антидиуретический гормон) и альдостерона из надпочечника.(6)

Наиболее важными функциями ренин-ангиотензиновой системы является контроль кровяного давления и клубочковой фильтрации (2).

Концентрация ренина в плазме зависит от концентрации ангиотензиногена в крови и, как следствие, ангиотензина II. Высокие уровни ангиотензина II в плазме подавляют выделение ренина (отрицательная реакция).

Определение уровней ренина в плазме является полезным для диагностики гипертензии и при терапевтическом наблюдении за больными артериальной гипертензией (3).

Повышение концентрации ренина в плазме у больных артериальной гипертензией происходит из-за первичного гиперальдостеронизма (4) в отличие от вазоренальной гипертензии (5), когда концентрации ренина и альдостерона повышенны.

IV. НА ЧЕМ ОСНОВАН МЕТОД

DIAsource Renin-IRMA представляет собой радиоиммунный анализ на основе окрашенной пробирки. Mab1, иммобилизованное антитело, крепится к нижней внутренней поверхности пластиковой пробирки. В пробирки добавляются калибраторы или образцы, которые сначала показывают низкоаффинную реакцию по отношению к Mab1. Добавлением Mab2, сигнального антитела с маркировкой ^{125}I , система завершается и включается иммунологическая реакция. После промывки по остаткам радиоактивных веществ на стенках пробирки определяется уровень концентрации антигена.

V. РЕАГЕНТЫ В КОМПЛЕКТЕ

Реагенты	Комплект на 96 тестов	Цветовая маркировка	Раствор для разбавления
Пробирки, окрашенные препаратом анти-Renin (моноклональное)	2 x 48	черный	Готово к использованию
Анти-Renin- ^{125}I (моноклональные антитела) в фосфатном буфере, бычья сыворотка и азид (<0.1%)	1 флакон 10,5 мл 760 кБк	красный	Готово к использованию
Контрольные маркеры 0 и -6 в человеческой плазме с тимолом См. точный объем на этикетке.	7 флаконов лиофилизированные	желтый	Добавить 2 мл дистиллированной воды
ПРОМЫ В. РАСТВР КОНЦН ТРТ.	1 флакон 40 мл	коричневый	Растворить 20 х дистиллированной водой (использовать магнитный смеситель)
Промывочный раствор (Гвин 20-NaCl)			
КОНТРОЛ №	2 флакона лиофилизированные	серебряный	Добавить 2 мл дистиллированной воды
Контрольный образец - N = 1 или 2 в человеческой плазме с тимоле			

Примечания: 1. Для разведения образца использовать нулевой калибровочный маркер.

2. 1 пг приготовления калибратора эквивалентно 2.2 +/- 0.2 μIU НИБСК 68/356

Чтобы получить результаты в $\mu\text{IU}/\text{мл}$ или mIU/l , объемы, выраженные в $\text{pg}/\text{мл}$, следует умножать на 2,2.

VI. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И РЕАГЕНТЫ

Необходимы следующие материалы, отсутствующие в комплекте поставки:

- Дистиллированная вода
- Пипетки для отмеривания: 100 μl , 300 μl и 2 мл (рекомендуется использовать мерные пипетки со съемными пластиковыми наконечниками)
- Пластиковые пробирки для общего подсчета
- Вортекс-миксер
- Шейкер для пробирок (400 об/мин)
- Магнитный смеситель
- Шприц-автомат 5 мл (тип "корнуол") для промывки

VII. АСПИРАЦИОННАЯ СИСТЕМА

- Аспирационная система (любая)
- Можно использовать любой гамма-счетчик с чувствительностью до ^{125}I (мин. производительность 70%).

VIII. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТА

- Калибраторы:** Разбавить контрольные вещества в 2 мл дистиллированной воды
! Для полного растворения: после восстановления выждать 30 минут на шейкере, а затем перемешать на вортексе.
- Контрольные образцы:** Разбавить контрольные вещества в 2 мл дистиллированной воды.
- Работа с промывочными растворами:** Приготовить достаточный объем рабочего раствора, добавив 19 объемов дистиллированной воды к 1 объему промывочного раствора (20x). Использовать магнитный смеситель для смешивания. Рабочую промывочную жидкость в конце для слить.

VIII. СРОК ГОДНОСТИ И ХРАНЕНИЯ РЕАГЕНТОВ

- В закупоренном исходном состоянии все компоненты в комплекте стабильны до завершения срока годности, указанного на этикетке, при условии хранения от 2 до 8°C.
- После восстановления калибраторы и контрольные образцы обладают низкой стабильностью. Использовать немедленно после разведения. Заморозить немедленно и хранить в аликоватах не более 6 недель при -20°. Они остаются стабильными после 1 цикла разморозки.
- Избегать последующих циклов размораживания и замораживания.
- Свежеприготовленный рабочий раствор для промывки следует использовать в тот же день.
- После первого использования маркер остается стабильным до истечения срока годности при условии хранения в герметичном флаконе при Т от 2 до 8°C.
- Физические изменения внешнего вида реагентов могут указывать на нестабильность или разрушение.

IX. СБОР И ПРИГОТОВЛЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Образцы: ЭДТА-плазма.
- Если тест не осуществлялся в течение 4 часов, плазму следует поместить на хранение в аликоватах при -20°C.
- Избегать последующих циклов размораживания и замораживания.

X. ПОРЯДОК ДЕЙСТВИЙ

- Обращение**
Запрещается использовать компоненты в комплекте после истечения срока годности.
Запрещается смешивать материалы из разных комплектов поставки.
До начала пользования довести температуру реагентов до комнатной.
Тщательно перемешать все реагенты и образцы умеренным взбалтыванием.

Использовать чистую пипетку с одноразовым наконечником для добавления любого из реагентов и образцов. Избегать загрязнения исходных материалов. Для большей точности рекомендуется использовать высокоточные пипетки или автоматизированное капельное оборудование.

Соблюдать инкубационный период.
Подготовить градуировочную кривую для каждого сеанса. Не допускается использование данных предыдущего сеанса.

B. Порядок действий

- Пометить окрашенные пробирки контрольного повтора для каждого калибратора, образца и контрольного маркера. Для суммарного подсчета маркировать 2 обычные пробирки
- Взволновать калибраторы, образцы и контрольные маркеры, и поместить 300 μl каждого в соответствующую пробирку.
- Развести 100 μl анти-Renin с йодным числом ^{125}I в каждой пробирке, включая неокрашенные, для суммарного подсчета.

4. Выдержать 180 минут при комнатной температуре на шейкере для пробирок (400 об/мин).
5. Продуть воздухом (или осушить) содержимое каждой пробирки (за исключением суммарного подсчета). Убедиться, что пластиковый наконечник аспиратора достигает донца окрашенной пробирки, и вся жидкость удалена.

Тестируемый образец	Объем ренина (пг/мл)	+ человеческий Hb 7,5 мг/мл (пг/мл)
1.	21,2	18,5
2.	57,1	50
Тестируемый образец	Объем ренина (пг/мл)	+ билирубин 0,2 мг/мл (пг/мл)
3..	22,6	20
4.	58,1	53,4

6. Промыть пробирки 2 мл рабочего промывочного раствора (за исключением суммарного подсчета) и продуть (либо осушить). Избегать вспенивания при добавлении рабочего промывочного раствора.
7. Снова промыть пробирки 2 мл рабочего промывочного раствора (за исключением суммарного подсчета) и продуть (либо осушить).
8. Оставить пробирки в вертикальном положении на две минуты. Затем продуть оставшуюся влагу.
9. Осуществить подсчет в пробирках гамма-счетчиком в течение 60 секунд.

XI. ПОДСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТА

1. Рассчитать средний показатель контрольного анализа.
2. На полулогарифмической или линованной бумаге построить график п/мин (ордината) для каждого калибратора против соответствующей концентрации ренина (абсцисса) и начертить градуировочную кривую через градуировочные точки. Очевидными провалами или всплесками значений можно пренебречь.
3. Считать показатели концентрации для каждого контрольного маркера и образца за счет интерполяции на градуировочной кривой.
4. Автоматизированное сведение данных упростит подсчет. Если будет использоваться автоматическая обработка результатов, рекомендуется воспользоваться 4-параметрическим логистическим способом припасовывания кривой.

XII. ТИПОВЫЕ ДАННЫЕ

Следующие данные представлены исключительно для иллюстрации. Не допускается их использование когда-либо вместо градуировочной кривой, отображающей реальное время.

RENIN-IRMA		п/мин.	B/T (%)
Общий счет			100
Калибратор	0 пг/мл 0 µIU/мл	152	
	4 пг/мл 8,8 µIU/мл	579	0,14
	9 пг/мл 19,8 µIU/мл	984	0,27
	47 пг/мл 103,4 µIU/мл	3826	1,18
	95 пг/мл 209 µIU/мл	8161	2,58
	250 пг/мл 550 µIU/мл	20851	6,67
	520 пг/мл 1144 µIU/мл	55190	17,73

1 пг приготовления калибратора эквивалентно 2,2 +/- 0,2 µIU НИБСК 68/356

XIII. ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Порог обнаружения

Исследовалось двенадцать нулевых калибраторов совместно с другими калибраторами. Порогом обнаружения, заявленным как эффективная концентрация среднего показателя при нулевом срезывании, плюс два стандартных отклонения, был показатель 0,78 пг/мл.

B. Специфичность

Перекрестная реакция препарата Prorenin в этом анализе Renin IRMA определялся за счет добавления различных концентраций препарата Prorenin в матрицу плазмы и измерением соответствующей реакции ренина. Перекрестная реакция препарата Prorenin составляла 0,3 %.

Анализировалась потенциальная интерференция гемоглобина в концентрации 7,5 мг/мл и билирубина 0,2 мг/мл. Этот тест (см. таблицу ниже) показал понижение значений плазмы приблизительно на 10%. Рекомендуется избегать гемолизированных образцов и образцов с содержанием билирубина.

C. Точность

ВНУТРИАНАЛИТИЧЕСКАЯ СХОДИМОСТЬ

Образец	№	$\text{} \pm \text{Ст.О.}$ (пг/мл)	К.В. (%)
A	10	20,2 ± 1,7	8,5
B	10	67,7 ± 2,0	3,0

МЕЖАНАЛИТИЧЕСКАЯ СХОДИМОСТЬ

Образец	№	$\text{} \pm \text{Ст.О.}$ (пг/мл)	К.В. (%)
A	6	15,5 ± 1,7	11
B	6	59,3 ± 2,4	4

С.О. Стандартное отклонение; К.В.: Коэффициент вариации

D. Точность

ПРОБА НА РАЗБАВЛЕНИЕ

Образец	Разбавление	Теоретич. концтр. (пг/мл)	Измеренная концтр. (пг/мл)
	1/4	258,6	
	1/8	129,3	125,5
	1/16	64,6	62,3
	1/32	32,3	29,4
	1/64	16,1	14,2
	1/128	8	6,7

Образец разбавлялся нулевым калибратором.

Показатель неразбавленного образца: 1034 пг/мл

ТЕСТ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ

Добавленный ренин (пг/мл)	Восстановленный ренин (пг/мл)	Восстановление (%)
11,8	10,5	89
24,2	21,4	88
57	53	93
117	96	82

F. Хук-эффект

Сигнал образца, насыщенного человеческим ренином до 90 000 пг/мл, превышает наивысшую концентрацию калибратора.

F. Референтные интервалы

Нормальный диапазон для ЭДТА-плазмы был определен на основании исследования 60 здоровых субъектов в период голодовки в возрасте от 20 до 60 лет: 40 мужчин и 20 женщин, не получавших эстроген-прогестерон лечение и лечение от гипертензии. От каждого субъекта отбиралось по две пробы крови: одна - через час после активной деятельности в распряженном положении, а другая - после часа покоя в лежачем положении.

Зафиксированные пределы - от 5 до 95 процентиелей.

Стоя 1,3 - 13,8 пг/мл

Лежа 1,0 - 8,2 пг/мл

Каждая лаборатория должна выработать собственный диапазон показателей.

Следует помнить, что на уровнях ренина существует множество факторов (возраст, поза, эстроген-лечение, препараты от гипертензии, и т.д.).

XIV. ОГРАНИЧЕНИЯ

- Материалы, взятые у пациента, получавшего препараты моноклональных антител мыши для диагностики или терапии, могут содержать человеческие антимышинные антитела (HAMA). Такие образцы в результате тестирования с применением комплекта для анализов, содержащего мышиные моноклональные антитела, могут давать как ошибочно завышенные, так и заниженные показатели.
- Нейтрофильные антитела в человеческой сыворотке могут взаимодействовать с реагентом иммуноглобулина, препятствующим нормальному иммunoлогическому анализу *in vitro*. Пациенты, обычно принимающие продукты, полученные из животных или сыворотки животных, могут быть предрасположены к такому воздействию, и если присутствуют нейтрофильные антитела, не исключаются аномальные показатели. Следует тщательно проверять результаты анализов пациента, у которого, возможно, имеются такие антитела.
- Если результаты не соответствуют клиническим наблюдениям, тогда для постановки диагноза потребуется дополнительная информация.

XV. ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Если результаты, полученные по контрольному образцу 1 и/или 2 находятся за пределами указаний на этикетке, тогда, если отсутствует удовлетворительное объяснение, такие результаты использовать не допускается.
- Каждая лаборатория может создать собственный комплект контрольных образцов, которые следует хранить в аликоватах замороженными.
- Критерием приемлемого на случай расхождений между контрольными результатами по образцам следует считать усредненную лабораторную практику.

XVI. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Меры безопасности

Только для диагностики *in vitro*.

В одном комплекте ^{125}I (период полураспада: 60 дней), активная ионизирующая X (28 keV) и γ (35,5 keV) радиация. К обращению с этим радиоактивным продуктом допускаются только уполномоченные лица. Приобретение, хранение, пользование и обмен радиоактивных продуктов осуществляется в рамках законодательства страны пользователя. Продукт запрещено применять на людях и животных. Обращение с радиоактивным продуктом осуществляется только в специально подготовленных местах в стороне от оживленных участков деятельности. Лаборатория обязана вести журнал регистрации выдачи и хранения радиоактивных материалов. Загрязненное радиоактивными веществами лабораторное оборудование и стеклянную посуду следует содержать отдельно во избежание перекрестного загрязнения различными радионизотопами.

Любые утечки радиоактивных веществ должны быть немедленно устранены согласно мерам безопасности по обращению с радиоактивными веществами. Утилизация радиоактивных отходов осуществляется согласно местным предписаниям и указаниям лиц, отвечающих за лабораторию. Соблюдение основных правил безопасности по обращению с радиоактивными веществами обеспечивает должный уровень защиты.

Компоненты человеческой крови, включенные в этот набор, тестираны по европейским правилам, утверждены по методике FDA, отрицательны для поверхностного антигена вируса гепатита B, антител к вирусу гепатита C, антител к ВИЧ 1 и 2. Ни один из известных методов не гарантирует отсутствия переноса гепатита, СПИД и иных инфекций через образцы человеческой крови.

Таким образом, с образцами реагента, сыворотки или плазмы следует обращаться согласно местным правилам техники безопасности. Все продукты животного происхождения и образцы отбирались от здоровых животных. Бычий компоненты отбираются в странах, где ТГЭ не замечена. Однако компоненты с содержанием животных образцов следует рассматривать как потенциально контагиозные.

Избегать контакта оголенной кожи с реагентами (азид натрия в качестве антисептика). Азид в комплекте может реагировать со свинцом и медью на пломбировке и, таким образом, создавать взрывоопасные азиды металлов. На этапе промывки раковину следует обильно промывать большим количеством воды во избежание отложения азидов на стенах.

Запрещается курить, пить, принимать пищу или накладывать косметику на рабочем месте. Запрещается осуществлять дозировка ртом. Пользоваться защитной одеждой и одноразовыми перчатками.

XVII. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

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

XVIII СВОДКА ПО ПРОТОКОЛУ

ИНКУБАЦИЯ	ОБЩИЙ СЧЁТ µl	КАЛИБРАТОРЫ КОНТРОЛЬНЫЙ ОБРАЗЕЦ µl	ОБРАЗЕЦ (ОБРАЗЦЫ) µl
Калибраторы (0 - 6), контрольные образцы	- -	300 -	- 300
Маркер	100	100	100
Инкубация	180 минут при комнатной Т. Взбалтывание при 400 об/мин		
Сепарация Рабочий промывочный раствор: Сепарация Рабочий промывочный раствор: Сепарация	-	Продуть (или осушить) 2 мл Продуть (или осушить) 2 мл Продуть (или осушить)	
Подсчет	Считать пробирки 60 секунд		