



IVD

CE

# Angiotensin I (PRA)-RIA

*KIP5361*

---

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

# History

---

## Summary of change:

<b>Current Version:</b> <b>230123</b>
New logo

Read entire protocol before use.

# Angiotensin I (PRA)-RIA

## I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of Angiotensin I in human EDTA plasma and the determination of Plasma Renin Activity (PRA) in human EDTA plasma.

## II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource Angiotensin I (PRA) - RIA Kit
- B. **Catalog number :** KIP5361 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.

Rue du Bosquet 2, 1348 Louvain-La-Neuve, Belgium

**For technical assistance or ordering information contact :**

**Tel : +32 (0) 10 84 99 00**

**Fax : +32 (0) 10 84 99 90**

## III. CLINICAL BACKGROUND

Renin is a proteolytic enzyme released by the juxtaglomerular cells of the kidney. The enzyme acts in general circulation to cleave its substrate, angiotensinogen, an alpha-2 globulin synthesized by the liver, in the decapeptide, angiotensin I.

Angiotensin I is a biologically inactive protein hormone and it is rapidly cleaved to a biologically active octapeptide angiotensin II, primarily in the lungs, by the activity of converting enzyme (ACE).

Angiotensin II has a very short half-life *in vivo* and is a very high potent vasopressor that plays an important role in hypertension and in blood pressure regulation. Angiotensin II plays also a role on aldosterone secretion by the adrenal gland.

The angiotensin II is rapidly degraded to inactive peptides fragments by enzymes present in plasma and tissues and for this reason it is difficult to measure the Angiotensin II levels in plasma.

As Angiotensin I represents directly the plasma renin activity, its measurement is used to determine the plasma renin activity (PRA) and to evaluate the renin-angiotensin system in disease states<sup>3,4</sup>

The PRA determination is useful for investigation of primary aldosteronism<sup>1,2</sup> (eg : adrenal carcinoma and adrenal cortical hyperplasia) and secondary aldosteronism<sup>5</sup> (renovascular disease, salt depletion, potassium loading, cardiac failure with ascites, pregnancy, Bartter syndrome)

The determination of PRA is also helpful to evaluate the prognosis and the appropriate therapy of patients with hypertension<sup>6</sup>.

Plasma renin activity (PRA) is quantified by measuring the rate of angiotensin I generation in plasma samples incubated at 37°C in presence of an enzyme inhibitor to avoid the conversion of angiotensin I to angiotensin II.

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

Plasma renin activity (PRA) is measured by the quantification of angiotensin I level in human plasma with a radioimmunoassay.

The method consists in 2 steps :


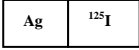
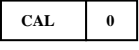
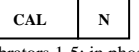
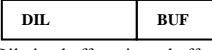


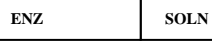
**Step 1:** Angiotensin I generation in plasma samples incubated at 37°C and at 4°C for the background value, in presence of an enzyme inhibitor to avoid angiotensin I enzymatic degradation.

**Step 2:** Radioimmunoassay :

A fixed amount of <sup>125</sup>I labelled angiotensin I competes with angiotensin I to be measured present in calibrators, controls and plasma samples for a fixed amount of antibody sites being immobilized to the wall of a polystyrene tube.

After 2 hours incubation at room temperature on a shaker an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed with 2 ml of wash solution and aspirated again. A calibration curve is plotted and the angiotensin I concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve. Plasma renin activity of samples is then determined by subtracting the angiotensin I concentration found at 37°C by the angiotensin I concentration found at 4°C, considering the dilution factor used during enzymatic incubation and divided by the incubation time of enzymatic incubation .

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Tests Kit	Colour Code	Reconstitution
 Tubes coated with anti angiotensin I	2 x 48	blue	Ready for use
 Ag <sup>125</sup> I <sup>125</sup> Iodine labelled angiotensin I HPLC grade	1 vial 150 kBq 10.5 ml	red	Ready for use
 CAL 0 Calibrator 0: in phosphate buffer with bovine serum albumin and Proclin	1 vial 2 ml	yellow	Ready for use
 CAL N Calibrators 1-5: in phosphate buffer with bovine serum albumin and Proclin (see exact values on vial labels)	5 vials 1 ml	yellow	Ready for use
 DIL BUF Dilution buffer: citrate buffer with Proclin and gentamycin	1 vial 12 ml	white	Ready for use
 WASH SOLN CONC Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
 CONTROL N Controls - N = 2 in phosphate buffer with bovine serum albumin and Proclin	2 vials 1 ml	silver	Ready for use
 ENZ SOLN Enzymatic solution: solution of enzymatic inhibitor in ethanol	1 vial 0.5 ml	white	Ready for use

**Note :** 1. Use Calibrator 0 for dilution of samples with values above the highest calibrator before step 1.  
2. Calibrators were calibrated against NIBSC 86/536

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 10 µl, 100 µl, 250 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)

3. Glass tubes (12 x 75 mm) for enzymatic step (closed with a cap): 2 glass tubes needed for each plasma sample tested
4. Water bath at 37°C
5. Ice bath
6. Vortex mixer
7. Magnetic stirrer
8. Tube shaker (300 to 700 rpm)
9. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
10. Aspiration system
11. Any gamma counter capable of measuring <sup>125</sup>I may be used (minimal yield 70%).

#### VII. REAGENT PREPARATION

**Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash solution (70x). 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, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- Freshly prepared working wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable, if kept in the original well-closed vial at 4°C until the tracer expiry date.
- After their first use Calibrators and controls are stable at 4°C until their expiry date .
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

#### IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

This kit is suitable only for EDTA plasma samples. Do not use heparin tubes. The following plasma collection procedure is recommended to prevent generation and degradation of angiotensin I.

Draw blood samples at room temperature. Do not chill EDTA collection tubes and don't store the collection tubes on ice.

Centrifuge the tube in a non-refrigerated centrifuge, and separate the plasma from the cells immediately after centrifugation, then aliquot and freeze immediately. Do not refrigerate. Cryoactivation, that is conversion of prorenin to renin, occurs when samples are chilled or exposed to temperatures of 6°C or lower for extended periods of time and when samples are chilled but remain in a liquid state. (i.e not frozen). Before analysis samples should be thawed rapidly to room temperature by standing them in lukewarm water.

Haemolyzed samples, icteric samples and lipemic samples must be discarded.

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.

**Dilution buffer and enzymatic solution have to be stored at 2-8°C and pipetted directly after being taken out of the fridge (cf step B1 of the procedure)**

Bring all other 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.

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

##### B. Procedure

##### B1. Enzymatic Step (in glass tubes)

**Only for EDTA plasma samples, not for calibrators and controls**  
**This step needs a water bath at 37°C and an ice bath at 4°C**

1. For each EDTA plasma sample, label 2 glass tubes.
2. Place one tube in the ice bath.
3. Dispense 250µl of plasma sample, freshly taken from the fridge, in this tube.
4. Add 10 µl of enzymatic solution freshly taken from the fridge, into the tube.
5. Add 250 µl of dilution buffer freshly taken from the fridge, into the tube.
6. Vortex the tube.

7. Transfer 250 µl of this mix in the second tube .
8. Cover each tube with a cap.
9. Place **immediately** one set of tubes into an ice bath at 4°C in a refrigerator, this is to determine the background value of angiotensin I.
10. Place the second set of tubes into a water bath at 37°C, this is for determination of generated angiotensin I at 37°C.
11. Incubate all tubes for 1 hour.
12. After incubation, transfer immediately tubes incubated at 37°C into the ice bath to cool them and stop angiotensin I generation.

### B2. Radioimmunoassay Step (in coated tubes)

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and treated plasma sample at 4°C and at 37°C. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Dispense 100 µl of calibrator or control or treated sample into the respective tubes
3. Dispense 100 µl of <sup>125</sup>Iodine labelled angiotensin I into each tube, including the uncoated tubes for total counts .
4. Incubate for 2 hours at room temperature (24 ± 4°C) on a tube shaker (300 to 700 rpm)
5. Aspirate the content of each tube (except total counts). Be sure that the 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. Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
7. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
8. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

## XI. CALCULATION OF RESULTS

### A. Calculation of angiotensin I concentrations

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula :

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Plot the (B/B<sub>0</sub>(%)) values for each calibrator point as a function of angiotensin I concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
4. Computer assisted methods can be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
5. By interpolation of the sample (B/B<sub>0</sub> (%)) values, determine the angiotensin I concentrations of the samples from the calibration curve.
6. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled angiotensin I (B<sub>0</sub>/T) must be checked.

### B. Calculation of plasma renin activity (PRA)

Plasma renin activity (PRA) is expressed in ng/ml/hour of the in vitro generation of angiotensin I.

The background angiotensin I concentration measured on plasma samples at 4°C is subtracted from the angiotensin I concentration generated at 37°C, then multiplied by the initial sample dilution.

For the calculation of PRA by using the following equation :

$$\text{PRA (ng of angiotensin I /ml/ h)} = \frac{(\text{ng/ml at } 37^\circ\text{C} - \text{ng/ml at } 4^\circ\text{C}) \times 2.04}{\text{Enzymatic incubation time (h)}}$$

## XII. TYPICAL DATA

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

Angiotensin I	cpm	B/Bo (%)
Total count	44052	
Calibrator		
0.0 ng/ml	24987	100.0
0.26 ng/ml	19438	77.8
0.75 ng/ml	11925	47.7
2.47 ng/ml	4420	17.7
9.11 ng/ml	1461	5.8
28.3 ng/ml	631	2.5

## XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

### A. Detection Limit

The LOB (Limit of Blank) was calculated by measuring the blank 24 times and was calculated as the mean – 2 standard deviations of the distribution of these values. The LOB was calculated to be 0.06 ng/ml.

The LOD (Limit of Detection) was calculated as the LOB + 1.65 standard deviations of a low concentration sample. The LOD was calculated to be 0.14 ng/ml.

The LOQ (Limit of Quantification) was calculated by testing 5 samples of low values 10 times. The LOQ was calculated to be 0.28 ng/ml/h.

### B. Specificity

The percentage of cross reaction was determined by testing plasma with spiked and unspiked crossreactants. The results are summarized in the following table:

Compound	Cross-Reactivity (%)
Angiotensin II	0.05
Angiotensin III	0.06
Angiotensinogen	ND
Tetradecapeptide	0.1

### C. Precision

#### C1. Precision on Angiotensin I measurement without enzymatic step.

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Sample	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Sample	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
C1	20	1.46 ± 0.04	2.7	C1	14	1.38 ± 0.07	5.1
C2	20	4.37 ± 0.17	3.9	C2	14	4.61 ± 0.23	5.0

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

#### C2. Precision on Plasma renin Activity calculated from tests on plasma measured in duplicates according the protocol of the kit.

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAYS			
Sample	N	<X> ± SD (ng/ml/h)	C.V. (%)	Sample	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
P1	10	1.99 ± 0.13	6.5	P1	6	0.34 ± 0.02	5.9
P2	10	10.35 ± 0.47	4.5	P14	6	0.42 ± 0.04	9.5

### D. Accuracy

#### RECOVERY TEST

Plasma Sample	Added angiotensin I (ng/ml)	Measured angiotensin I (ng/ml)	Recovery (%)
1	8.28	9.09	109.7
	4.52	4.58	101.4
	2.75	2.35	85.5
2	8.28	7.94	95.9
	4.52	4.5	99.6
	2.75	2.55	92.8
3	7.74	6.17	79.7
	3.76	3.04	80.7
	1.64	1.59	96.8
4	7.74	6.75	87.2
	3.76	3.13	83.4
	1.64	1.62	99.3

## DILUTION TEST

Plasma samples were diluted with the zero calibrator, then tested following the procedure of the kit.

Plasma Sample	Sample dilution	Theoretical concent. (ng/ml)	Measured concent. (ng/ml)
1	1/1	15.36	15.36
	1/2	7.68	7.32
	1/4	3.84	3.32
	1/8	1.92	1.99
2	1/1	37.35	37.35
	1/2	18.67	18.13
	1/4	9.34	7.78
	1/8	4.67	4.14
	1/16	2.33	2.23
	1/32	1.17	1.35

### XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.

If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Do not freeze-thaw more than twice.

Acceptance criteria for the difference between the duplo results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

### XV. EXPECTED VALUES

Each laboratory should establish its own range based on their local population. The PRA values here below are indicative only .

N	Patients	
19	Normal adult Supine	≤ 2.01 ng/ml/h
29	Normal adult Upright	≤ 4.95 ng/ml/h

### XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

#### Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains <sup>125</sup>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 European 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 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

- YOUNG WF Jr (1999)  
**Primary aldosteronism: A common and curable form of hypertension.**  
Cardiol Rev ; 7:207-214.
- YOUNG WF Jr (1997)  
**Pheochromocytoma and primary aldosteronism :diagnostic approaches.**  
Endocrinol Metab Clin North Am.,26:801-827.
- SEALEY J.E. (1975)  
**Radioimmunoassay of plasma renin activity.**  
Semin Nucl Med.,5(2):189-202.
- SPARANO F. (1978)  
**Behaviour of plasma renin activity and aldosterone during the first 72 h of life.**  
Clinical Endocrinology ,8, 207-211
- CUGINI P. (1992)  
**Secondary aldosteronism documented by plasma renin and aldosterone circadian rhythm in subjects with kidney or heart transplantation.**  
Ren Fail.,14(1):69-76
- W.GORDON WALKER (1976)  
**Relation between Plasma Renin Activity , Angiotensin, and Aldosterone and Blood Pressure in Mild Untreated Hypertension.**  
Circulation Research ,38(6),470-476

**XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS CONTROLS µl	SAMPLE(S) µl
<b><u>ENZYMATIC STEP</u></b> (in one glass tube)			
Calibrators / controls	-	-	-
Samples	-	-	250
Enzymatic solution	-	-	10
Dilution buffer	-	-	250
	<p>Vortex tubes.</p> <p>Transfer 250 µl of this mix in the second tube.</p> <p>Cover each tube with a cap.</p> <p>Place one tube into the ice bath in the refrigerator at 4°C and the other tube into the water bath at 37°C.</p> <p>Incubate 1 hour.</p> <p>Transfer tubes incubated at 37°C into the ice bath.</p>		
<b><u>RADIOIMMUNOASSAY</u></b> (in coated tubes)			
Calibrators / controls	-	100	-
Samples from enzymatic step at 4°C and at 37°C	-	-	100
Tracer	100	100	100
Incubation	2 hours at 24±4°C on a shaker (300 to 700 rpm)		
Separation	-	Aspirate	
Working Wash solution	-	2.0 ml	
Separation	-	Aspirate	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

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



Lea todo el protocolo antes de usar.

# Angiotensin I (PRA) -RIA

## I. INDICACIONES

Radioinmunoensayo para la medición cuantitativa *in vitro* de la angiotensina I en plasma con EDTA humano y la determinación de la actividad de renina plasmática (PRA) en plasma con EDTA humano.

## II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre comercial:** Angiotensina I (PRA) - RIA Kit de DIAsource
- B. **Número de catálogo:** KIP5361: 96 pruebas
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.

Rue du Bosquet 2, 1348 Louvain-La-Neuve, Bélgica

**Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos contacte con:**

**Tel: +32 (0) 10 84 99 00**

**Fax : +32 (0) 10 84 99 90**

## III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

La renina es una enzima proteolítica liberada por las células yuxtglomerulares del riñón. La enzima actúa sobre la circulación general para escindir su sustrato, angiotensinógeno, una globulina alfa-2 sintetizada por el hígado, en el decapeptido, angiotensina I.

La angiotensina I es una hormona proteica biológicamente inactiva y se escinde rápidamente a un octapéptido biológicamente activo La angiotensina II, principalmente en los pulmones, por la actividad de la enzima convertidora (ECA).

La angiotensina II tiene una vida media muy corta *in vivo* y es un vasopresor muy potente que juega un papel importante en la hipertensión y en la regulación de la presión arterial. La angiotensina II también desempeña un papel en la secreción de aldosterona por la glándula suprarrenal.

Las enzimas presentes en el plasma y los tejidos degradan la angiotensina II rápidamente en fragmentos de péptidos inactivos y por esta razón es difícil medir los niveles de angiotensina II en plasma.

Dado que la angiotensina I representa directamente la actividad de la renina plasmática, su medición se utiliza para determinar la actividad de la renina plasmática (PRA) y evaluar el sistema renina-angiotensina en estados de enfermedad<sup>3,4</sup>

La determinación de la PRA es útil para la investigación del aldosteronismo primario <sup>1,2</sup>(p. ej., carcinoma suprarrenal e hiperplasia cortical suprarrenal) y el aldosteronismo secundario <sup>5</sup> (enfermedad renovascular, agotamiento de la sal, carga de potasio, insuficiencia cardíaca con ascitis, embarazo, síndrome de Bartter)

La determinación de la PRA también es útil para evaluar el pronóstico y la terapia adecuada de los pacientes con hipertensión <sup>6</sup>.

La actividad de la renina plasmática (PRA) se cuantifica midiendo la velocidad de generación de angiotensina I en muestras de plasma incubadas a 37 °C en presencia de un inhibidor enzimático para evitar la conversión de angiotensina I en angiotensina II.

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

La actividad de la renina plasmática (PRA) se mide mediante la cuantificación del nivel de angiotensina I en plasma humano con un radioinmunoensayo.

El método consta en 2 pasos:

**Paso 1:** La generación de angiotensina I en muestras de plasma incubadas a 37 °C y a 4 °C para conocer el valor de fondo, en presencia de un inhibidor enzimático para evitar la degradación enzimática de la angiotensina I.


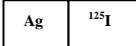
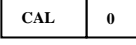
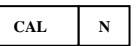
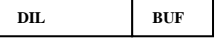

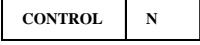

**Paso 2:** Radioinmunoensayo:

Una cantidad fija de de angiotensina I marcada con Y<sup>125</sup> compete con la angiotensina I que se va a medir presente en calibradores, controles y muestras de plasma por una cantidad fija de sitios de anticuerpos inmovilizados a la pared de un tubo de poliestireno.

Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente en un agitador, una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 2 ml de solución de lavado y se aspiran otra vez. Se traza una curva de calibración y se determinan las concentraciones de angiotensina I de las muestras mediante interpolación de la dosis en la curva de calibración.

Después, se determina la actividad de la renina plasmática de las muestras restando la concentración de angiotensina I encontrada a 37 °C por la concentración de angiotensina I encontrada a 4 °C, considerando el factor de dilución usado durante la incubación enzimática y dividido por el tiempo de incubación de la incubación enzimática.

#### V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit con 96 pruebas	Código de color	Reconstitución
 Tubos recubiertos con anti angiotensina I	2 x 48	azul	Listo para usar
 Angiotensina I marcada con Yodo <sup>125</sup> de calidad HPLC	1 vial 150 kBq 10,5 ml	rojo	Listo para usar
 Calibrador 0: en tampón fosfato con albúmina de suero bovino y Proclin	1 vial 2 ml	amarillo	Listos para usar
 Calibradores 1-5: en tampón fosfato con albúmina de suero bovino y Proclin (Véanse los valores exactos en las etiquetas del vial.)	5 viales 1 ml	amarillo	Listos para usar
 Tampón de dilución: tampón de citrato con Proclin y gentamicina	1 vial 12 ml	blanco	Listo para usar
 Solución de lavado (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (usar un agitador magnético).
 Controles - N = 2 en tampón fosfato con albúmina de suero bovino y Proclin	2 viales 1 ml	plata	Listo para usar
 Solución enzimática: solución de inhibidor enzimático en etanol.	1 vial 0,5 ml	blanco	Listo para usar

**Nota** :1. Usar el calibrador 0 para la dilución de muestras con valores por encima del calibrador más alto antes del paso 1.

2. Los calibradores se calibran frente a NIBSC 86/536

#### VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

El material siguiente es necesario pero no se proporciona en el kit:

1. Agua destilada
2. Pipetas para dispensación de: 10 µl, 100 µl, 250 µl y 1 ml (se recomienda usar pipetas de precisión con puntas de plástico desechables)
3. Tubos de vidrio (12 x 75 mm) para el paso enzimático (cerrado con una tapa): Se necesitan 2 tubos de vidrio para cada muestra de plasma analizada
4. Baño maría a 37 °C
5. Baño de hielo
6. Agitador tipo vórtex
7. Agitador magnético
8. Agitador de tubos (300 a 700 rpm)
9. Jeringa automática de 5 ml (tipo Cornwall) para lavado
10. Sistema de aspiración
11. Puede utilizarse cualquier contador gamma con capacidad para medir I<sup>125</sup> (eficiencia mínima del 70 %)

#### VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

**Solución de lavado de trabajo:** prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 69 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (70x). Use un agitador magnético para homogeneizar. Deseche la solución de lavado de trabajo no utilizada al final de la jornada.

#### VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir, todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad, indicada en la etiqueta, si se conservan entre 2 y 8 °C.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada deberá utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador se mantiene estable si se conserva en el vial original bien cerrado entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad.
- Después de su primer uso, los calibradores y controles se mantienen estables a 4 °C hasta su fecha de caducidad.
- Las alteraciones del aspecto físico de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

#### IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Este kit es adecuado para muestras de plasma con EDTA. No utilice tubos heparinizados. Para prevenir la generación y degradación de la angiotensina I, se recomienda el siguiente procedimiento de recolección de plasma. Tome las muestras de sangre a temperatura ambiente. No enfríe los tubos de recolección de EDTA y no almacene los tubos de recolección en hielo. Centrifugue el tubo en una centrífuga no refrigerada y separe el plasma de las células inmediatamente después de la centrifugación, después alcuota y congele inmediatamente. No refrigere. La críoactivación, es decir la conversión de prorenina a renina, se produce cuando las muestras se enfrían o se exponen a temperaturas de 6 °C o inferiores durante largos períodos de tiempo y cuando las muestras se enfrían pero permanecen en estado líquido. (es decir, no congeladas). Antes del análisis, las muestras deben descongelarse rápidamente a temperatura ambiente colocándolas en agua tibia.

Las muestras hemolizadas, ictericas y lipémicas deben desecharse. Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.

#### X. PROCEDIMIENTO

##### A. Notas sobre la manipulación

No utilice el kit o componentes pasada la fecha de caducidad.

No mezcle materiales de distintos lotes de kit.

**El tampón de dilución y la solución enzimática deben almacenarse a 2-8 °C y pipetarse directamente después de sacarlos del frigorífico (consulte el paso B1 del procedimiento)**

El resto de los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de usar. Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente.

Use una punta de pipeta desechable limpia para añadir cada reactivo y muestra diferente para evitar la contaminación cruzada. Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión. Prepare una curva de calibración para cada análisis, no utilice datos de análisis anteriores.

##### B. Procedimiento

##### B1. Paso enzimático (en tubos de vidrio)

**Solo para muestras de plasma EDTA, no para calibradores y controles**  
**Este paso necesita un baño con agua a 37 °C y un baño de hielo a 4 °C**

1. Para cada muestra de plasma EDTA, marque 2 tubos de vidrio.
2. Coloque un tubo en el baño de hielo.

- Dispense 250 µl de muestra de plasma, recién extraída del frigorífico, en este tubo.
- Agregue 10 µl de solución enzimática recién extraída del frigorífico al tubo.
- Agregue 250 µl de tampón de dilución recién extraída del frigorífico, dentro del tubo.
- Agite el tubo en un vórtex.
- Transfiera 250 µl de esta mezcla al segundo tubo.
- Cubra cada tubo con una tapa.
- Coloque **inmediatamente** un conjunto de tubos en un baño de hielo a 4 °C en un frigorífico, esto sirve para determinar el valor de fondo de la angiotensina I.
- Coloque el segundo conjunto de tubos en un baño de agua a 37 °C, esto sirve para determinar la angiotensina I generada a 37 °C.
- Incube todos los tubos durante 1 hora.
- Después de la incubación, transfiera inmediatamente los tubos incubados a 37 °C al baño de hielo para enfriarlos y detener la generación de angiotensina I.

## B2. Paso de radioinmunoensayo (en tubos recubiertos)

- Marque los tubos recubiertos por duplicado para cada calibrador, control y muestra de plasma tratados a 4 °C y a 37 °C. Para la determinación de recuentos totales, marque 2 tubos normales.
- Dispense 100 µl de calibrador o control o muestra tratados en los tubos respectivos
- Dispense 100 µl de angiotensina I marcada con Yodo<sup>125</sup> en cada tubo, incluidos los tubos sin recubrir para los recuentos totales.
- Incube durante 2 horas a temperatura ambiente (24± 4 °C) en un agitador de tubos (300 a 700 rpm)
- Aspire el contenido de cada tubo (excepto los de recuentos totales). Cerciórese de que la punta del aspirador llegue al fondo del tubo recubierto para retirar todo el líquido.
- Lave los tubos con 2 ml de solución de lavado de trabajo (excepto los de recuentos totales) y aspire. Evite que se forme espuma al añadir la solución de lavado de trabajo.
- Deje los tubos reposar en posición vertical durante dos minutos y aspire el resto de líquido.
- Mida los tubos en un contador gamma durante 60 segundos.

## XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

### A. Cálculo de las concentraciones de angiotensina I

- Calcule la media de las determinaciones por duplicado.
- Calcule la radiactividad unida como un porcentaje de la unión determinado en el punto del calibrador cero (0) según la fórmula siguiente:

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

- Represente los valores (B/B<sub>0</sub>(%)) del punto de cada calibrador como una función de la concentración de angiotensina I del punto de cada calibrador. Rechace los valores atípicos obvios.
- Se pueden usar métodos informáticos para generar la curva de calibración. Si se emplea un procesamiento automático de los resultados, se recomienda un ajuste de la curva mediante función logística de 4 parámetros.
- Determine las concentraciones de angiotensina I de las muestras en la curva de calibración mediante interpolación de los valores (B/B<sub>0</sub>(%)) de las muestras.
- Debe comprobarse, para cada ensayo, el porcentaje de trazador total unido en ausencia de angiotensina I sin marcar (B<sub>0</sub>/T).

### B. Cálculo de la actividad de la renina plasmática (PRA)

La actividad de la renina plasmática (PRA) se expresa en ng/ml/hora de la generación *in vitro* de la angiotensina I.

La concentración de angiotensina I de fondo medida en muestras de plasma a 4 °C se resta de la concentración de angiotensina I generada a 37 °C, después se multiplica por la dilución de la muestra inicial.

Para calcular PRA usando la siguiente ecuación:

$$PRA (\text{ ng de angiotensina I/ml/h }) = \frac{(\text{ng/ml a } 37^\circ\text{C} - \text{ng/ml a } 4^\circ\text{C}) \times 2,04}{\text{Tiempo de incubación enzimática (h)}}$$

## XII. DATOS TÍPICOS

Los datos siguientes son solo a efectos ilustrativos y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración generada en tiempo real.

Angiotensine I	cpm	B/Bo (%)
Recuento total	44052	
Calibrador		
0.0 ng/ml	24987	100.0
0.26 ng/ml	19438	77.8
0.75 ng/ml	11925	47.7
2.47 ng/ml	4420	17.7
9.11 ng/ml	1461	5.8
28.3 ng/ml	631	2.5

## XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

### A. Límite de detección

El LOB (límite de blanco) se calculó midiendo el blanco 24 veces y se calculó como la media: 2 desviaciones estándar de la distribución de estos valores. Se calculó que el LOB era de 0.06 ng / ml.

El LOD (límite de detección) se calculó como la desviación estándar de LOB + 1.65 de una muestra de baja concentración. Se calculó que el LOD era de 0.14 ng / ml.

El LOQ (límite de cuantificación) se calculó analizando 5 muestras de valores bajos 10 veces. El LOQ se calculó en 0.28 ng / ml / h.

### B. Especificidad

El porcentaje de reacción cruzada se determinó analizando el plasma con reactivos cruzados enriquecidos y no enriquecidos. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Compuesto	Reactividad cruzada (%)
Angiotensina II	0,05
Angiotensina III	0,06
Angiotensinógeno	ND
Tetradecapéptido	0,1

### C. Precisión

#### C1. Precisión en la medición de angiotensina I sin paso enzimático.

INTRAENSAYO				INTERENSAYO			
Muestr a	N	<X> ± DE (ng/ml)	C.V. (%)	Muestr a	N	<X> ± DE (ng/ml)	C.V. (%)
C1	20	1.46 ± 0.04	2.7	C1	14	1.38 ± 0.07	5.1
C2	20	4.37 ± 0.17	3.9	C2	14	4.61 ± 0.23	5.0

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

#### C2. Precisión en la actividad de la renina plasmática calculada a partir de pruebas en plasma medidas en duplicados según el protocolo del kit.

INTRAENSAYO				INTERENSAYO			
Muestr a	N	<X> ± DE (ng/ml/h)	C.V. (%)	Muestr a	N	<X> ± SE (ng/ml)	C.V. (%)
P1	10	1.99 ± 0.13	6.5	P1	6	0.34 ± 0.02	5.9
P2	10	10.35 ± 0.47	4.5	P14	6	0.42 ± 0.04	9.5

#### D. Exactitud

##### PRUEBA DE RECUPERACIÓN

Plasma Muestra	Angiotensina I añadida (ng/ml)	Angiotensina I medida (ng/ml)	Recuperación (%)
1	8,28	9,09	109,7
	4,52	4,58	101,4
	2,75	2,35	85,5
2	8,28	7,94	95,9
	4,52	4,5	99,6
	2,75	2,55	92,8
3	7,74	6,17	79,7
	3,76	3,04	80,7
	1,64	1,59	96,8
4	7,74	6,75	87,2
	3,76	3,13	83,4
	1,64	1,62	99,3

##### PRUEBA DE DILUCIÓN

Las muestras de plasma se diluyeron con el calibrador cero, después se analizaron siguiendo el procedimiento del kit.

Plasma Muestra	Dilución de la muestra	Concent. teórica (ng/ml)	Concent. medida (ng/ml)
1	1/1	15,36	15,36
	1/2	7,68	7,32
	1/4	3,84	3,32
	1/8	1,92	1,99
2	1/1	37,35	37,35
	1/2	18,67	18,13
	1/4	9,34	7,78
	1/8	4,67	4,14
	1/16	2,33	2,23
	1/32	1,17	1,35

#### XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Si los resultados obtenidos para el control 1 o el control 2 no se encuentran dentro del intervalo especificado en la etiqueta del vial, no se pueden utilizar dichos resultados, salvo que se proporcione una explicación satisfactoria sobre la discrepancia.

Cada laboratorio puede, si lo desea, realizar sus propias mezclas de muestras control, que deberían conservarse congeladas en alícuotas. No congele y descongele más de dos veces. Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados *in duplo* de las muestras deben basarse en las Buenas Prácticas de Laboratorio.

#### XV. VALORES ESPERADOS

Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo basado en su población local. Los valores de PRA que se muestran a continuación son solo indicativos.

N	Pacientes	
19	Adulto normal Supino	≤ 2.01 ng/ml/h
29	Adulto normal De pie	≤ 4.95 ng/ml/h

#### XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

##### Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*. Este kit contiene I<sup>125</sup> (semivida: 60 días), que emite radiaciones ionizantes X (28 keV) y γ (35,5 keV).

Este producto radiactivo se puede transferir a y ser utilizado únicamente por personas autorizadas; la adquisición, almacenamiento, uso e intercambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario final. Bajo ninguna circunstancia debe administrarse el producto a seres humanos ni animales. Toda manipulación de productos radiactivos debe llevarse a cabo en una zona designada para tal fin, alejada de zonas de paso. En el laboratorio debe custodiarse un libro de registro sobre la recepción y almacenamiento de materiales radiactivos. Los equipos y el material de vidrio de laboratorio, que podrían estar contaminados con sustancias radiactivas, deberían separarse para prevenir la contaminación cruzada de radioisótopos diferentes.

Los vertidos radiactivos deben limpiarse inmediatamente de conformidad con los procedimientos de seguridad radiológica. Los residuos radiactivos deben desecharse siguiendo la normativa y las recomendaciones locales de las autoridades con jurisdicción del laboratorio. El cumplimiento de las normas básicas sobre seguridad radiológica proporciona la protección adecuada.

Los componentes de la sangre humana incluidos en este kit se han analizado mediante métodos europeos aprobados y/o métodos aprobados por la FDA, habiendo dado negativos para HbsAg, anti-VHC y anti-VIH-1 y 2. Ningún método conocido puede ofrecer una garantía total de que los hemoderivados humanos no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por tanto, la manipulación de reactivos y las muestras de suero o plasma debe realizarse de conformidad con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos y derivados de animales se han obtenido de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países en los que no se ha notificado EEB. Sin embargo, los componentes que contengan sustancias animales deben tratarse como potencialmente infecciosos. Evite el contacto con la piel de los reactivos (azida sódica como conservante). La azida de este kit puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías y formar de este modo azidas metálicas muy explosivas. Durante el paso de lavado, lave el desagüe con agua abundante para prevenir la acumulación de azidas.

No fume, beba, coma ni use cosméticos en la zona de trabajo. No pipetee con la boca. Lleve ropa protectora y guantes desechables.

#### XVII. BIBLIOGRAFÍA

- YOUNG WF Jr (1999)  
**Primary aldosteronism: A common and curable form of hypertension.** *Cardiol Rev* ; 7:207-214.
- YOUNG WF Jr (1997)  
**Pheochromocytoma and primary aldosteronism :diagnostic approaches.** *Endocrinol Metab Clin North Am.*,26:801-827.
- SEALEY J.E. (1975)  
**Radioimmunoassay of plasma renin activity.** *Semin Nucl Med.*,5(2):189-202.
- SPARANO F. (1978)  
**Behaviour of plasma renin activity and aldosterone during the first 72 h of life.** *Clinical Endocrinology* ,8, 207-211
- CUGINI P. (1992)  
**Secondary aldosteronism documented by plasma renin and aldosterone circadian rhythm in subjects with kidney or heart transplantation.** *Ren Fail.*,14(1):69-76
- W.GORDON WALKER (1976)  
**Relation between Plasma Renin Activity , Angiotensin, and Aldosterone and Blood Pressure in Mild Untreated Hypertension.** *Circulation Research* ,38(6),470-476

**XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO**

	<b>RECIENTOS TOTALES µl</b>	<b>CALIBRADORES CONTROLES µl</b>	<b>MUESTR A(S) µl</b>
<b><u>PASO ENZIMATICO</u></b> (en un tubo de vidrio)			
Calibradores/controles	-	-	-
Muestras	-	-	250
Solución enzimática	-	-	10
Tampón de dilución	-	-	250
	<p>Tubos vorticiales.</p> <p>Transfiera 250 µl de esta mezcla al segundo tubo.</p> <p>Cubra cada tubo con una tapa.</p> <p>Coloque un tubo en el baño de hielo en el frigorífico a 4 °C y el otro tubo en el baño de agua a 37 °C.</p> <p>Incube 1 hora.</p> <p>Transfiera los tubos incubados a 37 °C al baño de hielo.</p>		
<b><u>RADIOINMUNOENSAYO</u></b> (en tubos recubiertos)			
Calibradores/controles	-	100	-
Muestras procedentes del paso enzimático a 4 °C y a 37 °C.	-	-	100
Trazador	100	100	100
Incubación	2 horas a 24 ± 4 °C en un agitador de tubos (300 a 700 rpm)		
Separación	-	Aspirar	
Solución de lavado de trabajo	-	2,0 ml	
Separación	-	Aspirar	
Recuento	Medir los tubos durante 60 segundos		