



IVD

CE

Angiotensin II-RIA

RB320

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version:
230123
New logo

Read entire protocol before use.

Angiotensin II – RIA

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of Angiotensin II in plasma

II. GENERAL INFORMATION

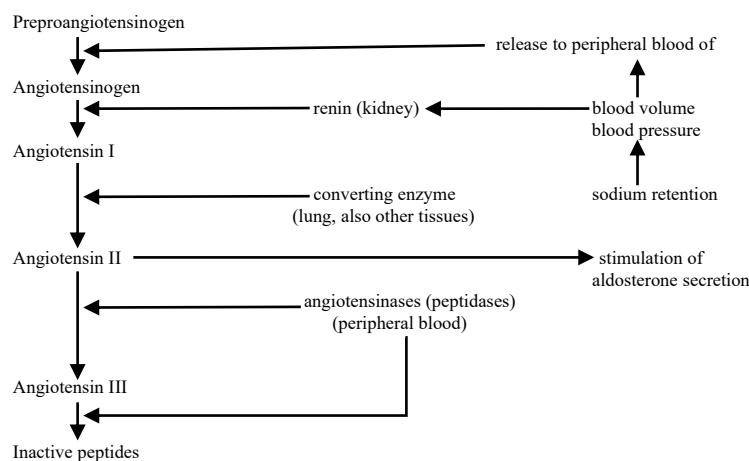
- A. Proprietary name : DIAsource Angiotensin II-RIA
- B. Catalog number : RB320 : 100 tests
- C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

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

III. CLINICAL BACKGROUND

1. Biological activities

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



2. Clinical application

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

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	100 Tests Kit	Colour Code	Reconstitution
[Ab] Antiserum: Rabbit anti-angiotensin II antiserum	1 vial Lyophilised	Blue	Add 22 mL distilled water
Ag ^{125}I TRACER: ^{125}I odine labelled Angiotensin II in phosphate buffer with human serum albumin and NaN_3 .	1 vial Lyophilised 56 kBq	Red	Add 25 mL distilled water
[DASP] Double antibody solid phase: Goat anti-rabbit Ig's bound to solid phase in phosphate buffer with human serum albumin, Tween and sodium azide. (<0.1%).	1 vial 11 mL	Green	Ready for use
[ASS BUF] Assay buffer : phosphate buffer containing human serum albumin and sodium azide, (<0.1%).	2 vials 50 mL	Black	Ready for use
[CAL] Angiotensin II Calibrator, 300 pmol/L. (see exact value on vial label)	1 vial Lyophilised	Yellow	Reconstitute with distilled water by the volume stated on vial label
[CONTROL N] Controls – N = 1 or 2 (see exact value on vial label)	2 vials Lyophilised	Silver	Add 2 mL distilled water

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Pipettes (100 μL , 200 μL , 1 mL, 2 mL, 5 mL).
2. Repeating dispensers (100 μL , 200 μL).
3. Measuring cylinder 25 mL.
4. Polystyrene tubes, polypropylene or glass-tubes.
5. Vortex.
6. Refrigerated centrifuge.
7. Ethanol p.A. 98%.
8. Vac-concentrator or N_2 (nitrogen).
9. Ice bath

VII. REAGENT PREPARATION

PRE PARE ALL REAGENTS 15 MINUTES BEFORE USE !

- A. **Antiserum:** Reconstitute with 22 mL distilled water. Mix gently. Stable at -20° C for at least 3 months after reconstitution
- B. **^{125}I -angiotensin II :** Reconstitute with 25 mL distilled water. Mix gently. Stable at -20° C until expiry date.
- C. **Double antibody solid phase :** Ready for use. The separation reagent should be placed on a magnetic stirrer for 10 minutes. It is possible to pipette the reagent with a repeating dispenser. Stable at 2-8° C.
- D. **Assay buffer :** Ready for use. Stable at 2-8° C until expiry date.
- E. **Angiotensin II Calibrator 300 pmol/L:** Reconstitute with distilled water by the volume stated on vial label. Mix gently. Stable at -20° C

for at least 3 months after reconstitution. Refer to table in section X. B. for the calibration curve preparation.

- F. **Controls :** Reconstitute each vial with 2 mL distilled water. Stable at -20° C for at least 3 months after reconstitution. The concentration of the control is found on the label of the vials (without extraction).

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified. Upon receipt of the kit, all reagents should be stored at 2-8°C.

The reconstituted reagents should be stored according to section VII. The reconstituted reagents are stable according to section VII, but no longer than the expiry date.

IX. SPECIMEN COLLECTION

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

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

X. PROCEDURE

A. Extraction procedure of plasma

1. Label one extraction tube for each patient sample. Label one additional tube (R) in order to estimate the extraction recovery.
2. Place the extraction tubes and ethanol on ice.
3. Pipette 1 mL of each sample into the appropriately labelled extraction tubes.
DO NOT EXTRACT CALIBRATORS AND CONTROLS.
4. Prepare a recovery estimation tube (R) :
- Pipette 1 mL of a random plasma sample into the recovery tube (R). The sample used for this recovery assay should have a protein matrix similar to the samples being tested.
- Add 200 μL ^{125}I -angiotensin II tracer into the tube (R).
- Extract this sample along with samples in step 6.
5. Prepare Total Recovery tubes (TR) :
- Pipette 200 μL ^{125}I -angiotensin II tracer into two tubes (TR).
- Add 200 μL assay buffer and mix.
- Cap and set aside these tubes to be counted for recovery calculation.
6. Add 4 mL chilled ethanol to each sample and Recovery tube (R).
7. Mix and vortex for 2 minutes.
8. Centrifuge all extraction tubes at 2000 g, for 15 minutes at 4°C.
9. Decant supernatant from each extraction tube into previous prepared clean, appropriately labelled 16 x 100 mm tubes.
10. Evaporate the supernatants under a stream of nitrogen to dryness (at max. 37°C).
11. Reconstitute the dried samples by adding 1 mL assay buffer and vortex thoroughly.
12. Proceed RIA procedure immediately or store the extracted samples at -20°C up to two weeks before using it in the assay.
13. Reconstitute the dried recovery sample (R) by adding 1 mL assay buffer and vortex thoroughly.
14. Pipette 400 μL of the reconstituted recovery sample tube (R) into two 12 x 75 mm tubes.
15. Count the total recovery (TR) and recovery (R) tubes for at least two minutes in a gamma counter.

Recovery calculation:

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

$$\% \text{ Recovery} : \frac{\text{cpm recovery tube (R)}}{\text{cpm total recovery tube (TR)}} \times 1.0 / 0.4$$

B. Preparation of Calibrator solutions

Dilution	Angiotensin II Calibrator	Concentration 300 pmol/L
1000 μL of Angio II Calibrator + 1000 μL assay buffer. Vortex	Calibrator a	150 pmol/L
1000 μL of Calibrator a + 1000 μL assay buffer. Vortex	Calibrator b	75 pmol/L
1000 μL of Calibrator b + 1000 μL assay buffer. Vortex	Calibrator c	37.5 pmol/L

1000 µL of Calibrator c + 1000 µL assay buffer. Vortex	Calibrator d	18.8 pmol/L
1000 µL of Calibrator d + 1000 µL assay buffer. Vortex	Calibrator e	9.4 pmol/L
1000 µL of Calibrator e + 1000 µL assay buffer. Vortex	Calibrator f	4.7 pmol/L

C. Assay Procedure

- Keep assay tubes and reagents in an ice bath during all pipetting steps.
- Pipette 400 µL of each Calibrator, 400 µL of controls and 400 µL of each plasma extract in duplicate into the corresponding labelled polystyrene tubes.
- Add 400 µL of assay buffer to the max. binding tubes (0 pmol/L).
- Add 600 µL of assay buffer to the NSB (blank) tubes.
- Add 200 µL of angiotensin II antiserum to each tube, except blank and TC-tubes.
- Vortex and incubate for 6 hours at 2-8°C.
- Add 200 µL of ¹²⁵I-Angiotensin II tracer to all tubes.
- Vortex all tubes and incubate at 2-8°C for 18-22 hours.
- While stirring continuously add 100 µL of the double antibody solid phase to all tubes, except TC-tubes.
- Vortex and incubate 30-60 minutes. at 2-8°C.
- Centrifuge all tubes for 15 minutes at 1700 g at 4°C.
- Decant the supernatants carefully.
- Count residue for 1-2 minutes.

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

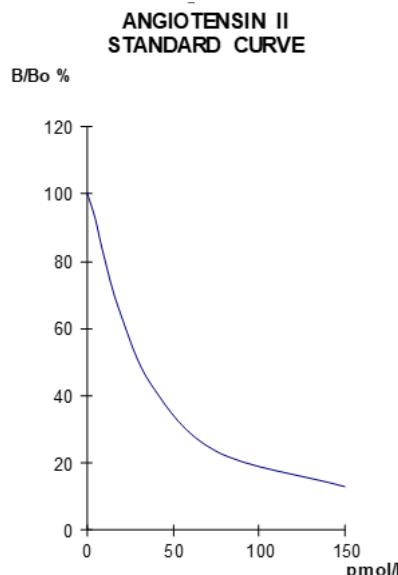
For example:

Patient sample concentration measured from the curve: 20 pmol/L
 Extraction recovery measured after extraction : 65%
 Patient sample concentration corrected : $\frac{20 \times 100}{65} = 30.8 \text{ pmol/L}$

Calibration Curve Data

	Average cpm	Corrected cpm	% B/Bo	Results (pmol/L)
Total counts	18582			
NSB	678			
Calibrator 0 pmol/L	9559	8881	100	
Calibrator f 4.7 pmol/L	8880	8202	92.4	
Calibrator e 9.4 pmol/L	7957	7279	82.0	
Calibrator d 18.8 pmol/L	7039	5781	65.1	
Calibrator c 37.5 pmol/L	4508	3830	43.1	
Calibrator b 75 pmol/L	2770	2099	23.6	
Calibrator a 150 pmol/L	1846	1168	13.1	13.1
Control low	7359	6681	75.2	
Control high	3145	2467	27.8	63.1

Example of Calibration Curve



XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Sensitivity

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

B. Precision

Within-run					Between-run				
	n	Mean pmol/L	SD	% CV		n	Mean pmol/L	SD	% CV
sample A	20	13.3	0.44	3.3	sample A	6	11.6	0.55	4.8
sample B	20	64.9	1.97	3.0	sample B	6	60.9	2.4	3.9

C. Accuracy

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

D. Specificity

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

Peptide Cross-reaction

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

E. Interference

Samples displaying cloudiness, haemolysis, hyperlipemia or containing fibrin may give inaccurate results.

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

Controls should be carried out in each assay run. Two controls are included in the kit, the value (without extraction procedure) is indicated on the labels of the vials.

Use controls as recommended by the control plasma manufacturer and in accordance with reference laboratories practice to monitor the accuracy and precision of reagents and techniques.

XV. REFERENCE INTERVALS

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

Observed Range: 19 - 38 pmol/L

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

Materials derived from human blood and used in the preparation of this kit were tested and found negative for hepatitis B surface antigen (HBsAg), antibodies to HCV and for antibodies to HIV-1 and HIV-2. However, handle all components as a possible source of infection.

The reagents in this kit contain sodium azide. Contact with copper or lead drain pipes may result in the cumulative formation of highly explosive azide deposits. On disposal of the reagents in the sewerage, always flush with copious amounts of water, which prevents metallic azide formation. Plumbing suspected of being contaminated with these explosive deposits should be cleaned thoroughly with 10% sodium hydroxide solution.

This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations. The radioactive material included may be received, acquired, possessed and used only by physicians, clinical laboratories or hospitals for in-vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulation of each country.

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

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

For more information, see Material Safety Data sheet (MSDS).

XVII. BIBLIOGRAPHY

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

8. Ch. Klett.
Clin. Exp. Hypert. 9, 2027-2047 (1987).
9. J.F.E. Mann.
Clin. Exp. Hypert. 10, 151-168 (1988).
10. J.J. Morton.
D.J. Webb, Clinical Science 68, 482-484 (1985).

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	Total count	NSB	Calibrator (0)	Calibrators (1-6)	Controls	Sample s					
Assay buffer	-	600 μ L	400 μ L	-	-	-					
Calibrators	-	-	-	400 μ L	-	-					
Controls	-	-	-		400 μ L	-					
Samples	-	-	-		-	400 μ L					
Antiserum	-	-	200 μ L	200 μ L	200 μ L	200 μ L					
Vortex and incubate for 6 hours at 2-8°C											
^{125}I Tracer	200 μ L										
Vortex and incubate for 18-22 hours at 2-8°C											
Double Ab Solid phase	-	100 μ L									
Vortex and incubate for 30-60 min at 2-8°C											
Vortex and centrifuge for 15 min (1700 g) at 4°C											
Decant or aspirate the supernatant and count the radioactivity of the residue											

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

Lire l'intégralité du protocole avant utilisation.

Angiotensin II – RIA

I. UTILISATION PRÉVUE

Dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'angiotensine II dans le plasma.

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. Nom de spécialité : DIAsource Angiotensin II-RIA
- B. Numéro de référence : RB320 : 100 tests
- C. Fabriqué par : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

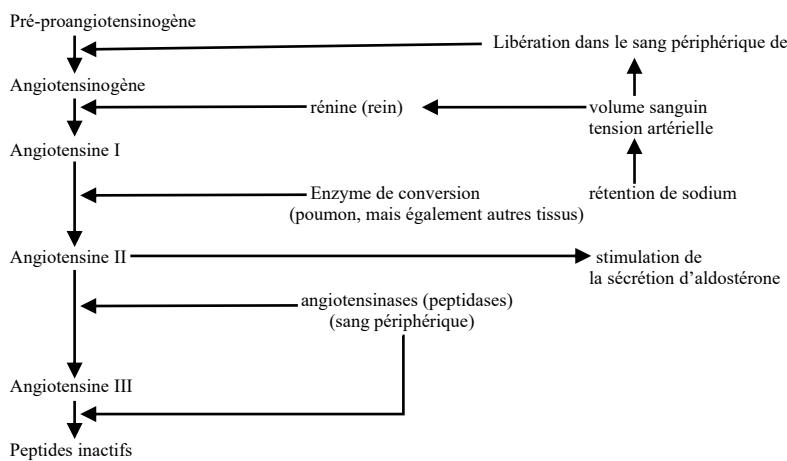
Pour une assistance technique ou des renseignements sur les commandes, contacter :
Tél. : +32 (0) 10 84.99.11 Fax : +32 (0) 10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

1. Activités biologiques

L'angiotensine II est le produit biologique actif du système rénine-angiotensine (1,2).

L'octapeptide angiotensine II (poids moléculaire = 1 046) est le plus puissant vasoconstricteur physiologique connu. Il est synthétisé dans le foie à partir d'une grande protéine précurseur (pré-proangiotensinogène), puis libéré au cours d'une suite d'étapes protéolytiques de catalyse par des enzymes provenant de différents tissus (1, 2, 4). L'angiotensine II a une durée de vie très courte dans le plasma : une fois générée à partir de l'angiotensine I, elle est dégradée en peptides physiologiquement inactifs par plusieurs peptidases plasmatiques, à une demi-vie plasmatique de moins d'une minute (5). Le schéma ci-dessous décrit le système rénine-angiotensine :



2. Applications cliniques

Puisque la génération de l'angiotensine II à partir de l'angiotensinogène, via l'angiotensine I, est fortement affectée par les modifications de l'activité de la rénine, tous les facteurs externes influençant l'activité de la rénine doivent être soigneusement pris en compte : l'activité de la rénine est élevée lors de la grossesse, après une diminution du sodium, en position debout et sous l'influence d'un éventail de médicaments (par ex., les contraceptifs oraux, l'adrénaline, les vasodilatateurs anti-hypertenseurs, les diurétiques, et la spironalactone et la progestérone à doses élevées). Les facteurs qui réduisent l'activité de la rénine sont : la position horizontale, l'augmentation de la prise de sodium, l'a-méthyl-DOPA, la L-DOPA, le propranolol, la réserpine, la clonidine et l'âge avancé. L'activité de la rénine est également sujette à un rythme diurne avec des valeurs maximales le matin. Le dosage radio-immunologique de l'angiotensine II a une application établie dans le traitement et la surveillance de l'hypertension.

IV. PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Après l'extraction des échantillons plasmatiques, l'angiotensine II est mesurée par dosage radio-immunologique par compétition. Ce dosage radio-immunologique utilise de l'antisérum anti-angiotensine II de lapin et un traceur d'angiotensine II marqué à l'iode radioactif. Les phases liées et libres sont séparées par un second anticorps lié aux particules en phase solide, le tout suivi d'une étape de centrifugation. La radioactivité dans les fractions liées est mesurée et une courbe d'étalonnage type peut être générée.

V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	Trousse de 100 tests	Code couleur	Reconstitution
[Ab] Antisérum : Antisérum d'anti-angiotensine II de lapin	1 flacon lyophilisé	Bleu	Ajouter 22 ml d'eau distillée
Ag ¹²⁵I TRACEUR : Angiotensine II marquée à l'iode ¹²⁵ dans un tampon phosphate avec de l'albumine sérique humaine et du NaN ₃ .	1 flacon lyophilisé 56 kBq	Rouge	Ajouter 25 ml d'eau distillée
[DASP] Phase solide à double anticorps : Ig de chèvre anti-lapin liée à la phase solide dans un tampon de phosphate avec de l'albumine sérique humaine, de l'azoture de sodium et Tween. (< 0,1 %).	1 flacon 11 ml	Vert	Prêt à l'emploi
[ASS BUF] Tampon de dosage : tampon phosphate contenant de l'albumine sérique humaine et de l'azoture de sodium (< 0,1 %).	2 flacons 50 ml	Noir	Prêt à l'emploi
[CAL] Étalon d'angiotensine II, 300 pmol/l. (voir les valeurs exactes sur l'étiquette du flacon)	1 flacon lyophilisé	Jaune	Reconstituer avec le volume d'eau distillée indiqué sur l'étiquette du flacon.
[CONTROL N] Contrôles – N = 1 ou 2 (voir les valeurs exactes sur l'étiquette du flacon)	2 flacons lyophilisés	Argent	Ajouter 2 ml d'eau distillée

VI. MATÉRIEL NON FOURNI

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

1. Pipettes (100 µl, 200 µl, 1 ml, 2 ml, 5 ml)
2. Distributeurs à répétition (100 µl, 200 µl)
3. Cylindre de mesure (25 ml)
4. Tubes en polystyrène, en polypropylène ou en verre.
5. Vortex
6. Centrifugeuse réfrigérée
7. Éthanol p.a. 98 %
8. Concentrateur sous vide ou N₂ (azote).
9. Bain à glace

VII. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

PRÉPARER TOUS LES RÉACTIFS 15 MINUTES AVANT LEUR UTILISATION !

- A. **Antisérum :** reconstituer avec 22 ml d'eau distillée. Mélanger doucement.
Conserver à -20 °C pendant au moins 3 mois après la reconstitution.
- B. **Angiotensine II marquée à l'iode¹²⁵ :** reconstituer avec 25 ml d'eau distillée. Mélanger doucement. Stable à -20 °C jusqu'à la date

d'expiration.

- C. **Phase solide à double anticorps :** prêt à l'emploi. Le réactif de séparation doit être placé dans un agiteur magnétique pendant 10 minutes. Il est possible de pipeter le réactif avec un distributeur à répétition. Stable entre 2 et 8 °C.
- D. **Tampon de dosage :** prêt à l'emploi. Stable à 2-8 °C jusqu'à la date d'expiration.
- E. **Étalon d'angiotensine II à 300 pmol/l :** reconstituer avec le volume d'eau distillée indiqué sur l'étiquette du flacon. Mélanger doucement. Stable à -20 °C pendant au moins 3 mois après la reconstitution. Voir le tableau section X. B. pour la préparation de la courbe d'étalonnage.
- F. **Contrôles :** reconstituer chacun des flacons avec 2 ml d'eau distillée. Stable à -20 °C pendant au moins 3 mois après la reconstitution. La concentration des contrôles figure sur l'étiquette des flacons (sans extraction).

VIII. CONSERVATION ET DATES D'EXPIRATION DES RÉACTIFS

Les composants de cette trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée s'ils sont conservés comme indiqué.

À réception de la trousse, tous les réactifs doivent être conservés à 2-8 °C. Les réactifs reconstitués doivent être conservés conformément aux informations fournies en section VII. Les réactifs reconstitués sont stables conformément aux informations fournies en section VII, mais pas au-delà de la date d'expiration.

IX. RECUEIL DE L'ÉCHANTILLON

Il est recommandé de normaliser soigneusement les conditions de prélèvement et de préparation du patient. En raison de l'extrême labilité de l'angiotensine II dans les liquides biologiques, il convient d'être particulièrement prudent pour s'assurer que l'échantillon de sang est correctement prélevé :

- Prélever le sang d'un patient à jeun en position couchée dans des tubes froids contenant de l'EDTA.
- Centrifuger immédiatement à 4 °C pour séparer le plasma.
- Congeler immédiatement l'échantillon dans des tubes en plastique à -20 °C jusqu'au dosage.

X. PROCÉDURE

A. Procédure d'extraction du plasma

1. Étiqueter un tube d'extraction pour chaque échantillon de patient. Étiqueter un tube supplémentaire (R) afin d'estimer la récupération par extraction.
2. Placer les tubes d'extraction et d'éthanol sur de la glace.
3. Pipeter 1 ml de chaque échantillon dans les tubes d'extraction étiquetés appropriés.
NE PAS EXTRAIRE LES ÉTALONS ET LES CONTRÔLES.
4. Préparer un tube d'estimation de la récupération (R) :
 - Pipeter 1 ml d'un échantillon de plasma aléatoire dans le tube de récupération (R). L'échantillon utilisé pour ce dosage de la récupération doit avoir une matrice protéique similaire à celle des échantillons testés.
 - Ajouter 200 µl du traceur d'angiotensine II marqué à l'iode¹²⁵ dans le tube (R).
 - Extraire cet échantillon avec les échantillons de l'étape 6.
5. Préparer un tube de récupération totale (TR) :
 - Pipeter 200 µl du traceur d'angiotensine II marqué à l'iode¹²⁵ dans deux tubes (TR).
 - Ajouter 200 µl de tampon de dosage et mélanger.
 - Boucher ces tubes et les mettre de côté en vue de leur utilisation pour le calcul de la récupération.
6. Ajouter 4 ml d'éthanol froid à chaque échantillon et au tube de récupération (R).
7. Mélanger et passer au vortex pendant 2 minutes.
8. Centrifuger tous les tubes d'extraction à 2 000 g pendant 15 min à 4 °C.
9. Décanter le surnageant de chaque tube d'extraction et le placer dans des tubes de 16 x 100 mm propres, précédemment préparés et correctement étiquetés.
10. Évaporer à sec les surnageants en les passant sous un courant d'azote (à 37 °C max.).
11. Reconstituer les échantillons séchés en ajoutant 1 ml de tampon de dosage, puis les mélanger complètement au vortex.
12. Effectuer immédiatement la procédure de dosage radio-immunologique ou conserver les échantillons extraits à -20 °C jusqu'à deux semaines avant leur utilisation.
13. Reconstituer l'échantillon de récupération (R) séché en ajoutant 1 ml de tampon de dosage, puis le mélanger complètement au vortex.
14. Pipeter 400 µl du tube d'échantillon de récupération (R) reconstitué dans deux tubes de 12 x 75 mm.

15. Placer les tubes de récupération totale (TR) et de récupération (R) pendant au moins deux minutes dans un compteur de rayons gamma.

Calcul de la récupération :

Calculer le % de récupération en divisant le cpm dans les tubes de récupération (R) par le cpm dans les tubes de récupération totale (TR) et en multipliant le résultat par 1,0/0,4 :

$$\% \text{ de récupération : } \frac{\text{cpm du tube de récupération (R)}}{\text{cpm du tube de récupération totale (TR)}} \times 100$$

0,4

B. Préparation des solutions d'étalons

Dilution	Étalon d'angiotensine II	Concentration 300 pmol/l
1 000 µl d'étalon d'angiotensine II + 1 000 µl de tampon de dosage. Vortex	Étalon a	150 pmol/l
1 000 µl de l'étalon a + 1 000 µl de tampon de dosage. Vortex	Étalon b	75 pmol/l
1 000 µl de l'étalon b + 1 000 µl de tampon de dosage. Vortex	Étalon c	37,5 pmol/l
1 000 µl de l'étalon c + 1 000 µl de tampon de dosage. Vortex	Étalon d	18,8 pmol/l
1 000 µl de l'étalon d + 1 000 µl de tampon de dosage. Vortex	Étalon e	9,4 pmol/l
1 000 µl de l'étalon e + 1 000 µl de tampon de dosage. Vortex	Étalon f	4,7 pmol/l

C. Procédure de dosage

- Conserver les tubes à essai et les réactifs dans un bain à glace lors des étapes de pipetage.
- Pipeter 400 µl de chaque étalon, 400 µl des contrôles et 400 µl de chaque «échantillon plasmatique extrait en double dans les tubes en polystyrène étiquetés correspondants.
- Ajouter 400 µl de tampon de dosage aux tubes de liaison max. (0 pmol/l).
- Ajouter 600 µl de tampon de dosage dans les tubes NSB (vides).
- Ajouter 200 µl d'antisérum anti-angiotensine II dans chaque tube, à l'exception des tubes vides et TC.
- Mélanger au vortex et incuber pendant 6 heures entre 2 et 8 °C.
- Ajouter 200 µl du traceur d'angiotensine II marqué à l'iode¹²⁵ dans tous les tubes.
- Mélanger tous les tubes au vortex et incuber à 2-8 °C pendant 18-22 heures.
- Tout en remuant en continu, ajouter 100 µL de phase solide à double anticorps à tous les tubes, à l'exception des tubes TC.
- Mélanger au vortex et incuber pendant 30 à 60 minutes à 2-8 °C.
- Centrifuger tous les tubes pendant 15 min à 1 700 g à 4 °C.
- Décanter soigneusement les surnageants.
- Compter les résidus pendant 1-2 minutes.

XI. CALCUL DES RÉSULTATS

- Soustraire le taux de comptage moyen (cpm) des tubes NSB du taux de comptage moyen (cpm) des répliques des étalons, des contrôles et des échantillons de patients.
- Générer une courbe d'étalonnage en générant le tracé du cpm, du % B/Bo ou du % B/T de la fraction liée précipitée en fonction de la concentration des étalons d'angiotensine II.
- Pour obtenir la concentration en angiotensine II dans les échantillons de patients extraits et dans les contrôles, leur cpm, % B/Bo ou % B/T des fractions liées précipitées sont interpolés à partir de la courbe d'étalonnage générée.
- La courbe d'étalonnage peut également être générée par ordinateur. Pour la réduction automatisée des données, les méthodes de régression logistique (Logit) et des splines peuvent être utilisées.
- Corriger les valeurs plasmatiques pour le % de récupération d'extraction.

Par exemple :

Concentration dans l'échantillon de patient mesurée à partir de la courbe : 20 pmol/l

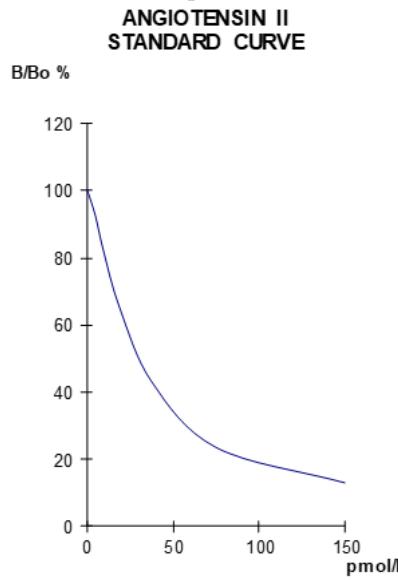
Récupération d'extraction mesurée après l'extraction : 65 %

Concentration dans l'échantillon de patient corrigée : $\frac{20 \times 100}{65} = 30,8 \text{ pmol/l}$

Données de la courbe d'étalonnage

	Moyenne CPM	Corrigée CPM	% B/Bo	Résultats (pmol/l)
Décomptes totaux	18 582			
NSB	678			
Étalon 0 pmol/l	9 559	8 881	100	
Étalon f 4,7 pmol/l	8 880	8 202	92,4	
Étalon e 9,4 pmol/l	7 957	7 279	82,0	
Étalon d 18,8 pmol/l	7 039	5 781	65,1	
Étalon c 37,5 pmol/l	4 508	3 830	43,1	
Étalon b 75 pmol/l	2 770	2 099	23,6	
Étalon a 150 pmol/l	1 846	1 168	13,1	
Contrôle faible	7 359	6 681	75,2	13,1
Contrôle élevé	3 145	2 467	27,8	63,1

Exemple de courbe d'étalonnage



XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

A. Sensibilité

La sensibilité est estimée à 3 écarts-types par rapport à l'étalon zéro, soit 2,0 pmol/l.

B. Précision

Intra-cycle					Inter-cycle				
	n	Moyenne (pmol/l)	É-T	% CV		n	Moyenne (pmol/l)	É-T	% CV
Échantillon A	20	13,3	0,44	3,3	Échantillon A	6	11,6	0,55	4,8
Échantillon B	20	64,9	1,97	3,0	Échantillon B	6	60,9	2,4	3,9

C. Exactitude

Récupération			
Quatre échantillons différents sont enrichis avec différentes quantités d'étalon d'angiotensine II			
Échantillon	Conc. attendue (pmol/l)	Conc. observée (pmol/l)	% de récupération
A1	12,4	12,3	99,2
A2	23,9	23,5	96,8
A3	27,2	22,0	103,0
A4	46,0	51,1	111,0

D. Spécificité

L'antisérum anti-angiotensine II est élevé chez les lapins. Les réactivités croisées suivantes ont été mesurées à 50 % de liaison (B/Bo).

Peptide Réaction croisée

Angiotensine II	100
Angiotensine I	< 0,1
Leu-Heptapeptide	100
Asn ¹ -Val ⁵ Angiotensine II	30
Sar ¹ Ile ⁸ Angiotensine II	100
Angiotensine III	80

E. Interférence

Les échantillons présentant une turbidité, une hémolyse, une hyperlipidémie ou contenant de la fibrine peuvent donner des résultats inexacts.

XIV. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

Les contrôles peuvent être effectués dans chaque cycle de dosage. Deux contrôles sont inclus dans la trousse, leur valeur (sans la procédure d'extraction) est indiquée sur l'étiquette des flacons. Utiliser les contrôles comme recommandé par le fabricant des contrôles plasmatiques et conformément aux pratiques de laboratoire de référence afin de surveiller l'exactitude et la précision des réactifs et des techniques.

XV. INTERVALLES DE RÉFÉRENCE

Chaque laboratoire doit établir son propre intervalle de valeurs attendues. Des échantillons de sang ont été prélevés auprès de 11 adultes apparemment en bonne santé (entre 9h00 et 10h00 du matin) et les concentrations en angiotensine II ont été déterminées.

Intervalle observé : 19-38 pmol/l.

XVI. PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Les matières issues du sang humain et utilisées pour la préparation de cette trousse ont été testées et sont considérées comme négatives à l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg), aux anticorps contre le VHC et aux anticorps contre le VIH-1 et le VIH-2. Cependant, il convient de manipuler tous les composants comme d'éventuelles sources d'infection.

Les réactifs de cette trousse contiennent de l'azoture de sodium. Leur contact avec les canalisations en cuivre ou en plomb est susceptible de provoquer l'accumulation de dépôts d'azoture hautement explosifs. Lors de l'évacuation des réactifs dans les canalisations d'évacuation des eaux usées, toujours rincer abondamment à l'eau pour prévenir la formation d'azotures métalliques. Les canalisations susceptibles d'avoir été contaminées avec ces dépôts explosifs devront être soigneusement nettoyées à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium à 10 %.

Cette trousse contient de l'iode¹²⁵ (demi-vie : 60 jours) émettant des radiations ionisantes X (28 keV) et γ (35,5 keV). Les matières radioactives incluses doivent être reçues, acquises, détenues et utilisées uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques ou des hôpitaux en vue d'analyses *in vitro* cliniques ou de laboratoire n'impliquant pas l'administration interne ou externe des matières, ni la radiation consécutive, à des êtres humains ou des animaux. Sa réception, son acquisition, sa possession, son utilisation et son transfert sont soumis à la réglementation de chaque pays.

Le respect des règles élémentaires de sûreté radiologique doit permettre une protection adéquate.

- Ne pas manger, boire, fumer ou utiliser de produits cosmétiques où des matières radioactives sont utilisées.
- Ne pas pipeter les solutions radioactives à la bouche.
- Éviter tout contact direct avec toutes les matières radioactives en utilisant des équipements de protection tels que des blouses de laboratoire et des gants jetables.
- Toute activité radiologique doit être effectuée dans une zone désignée.
- Les matières radioactives doivent être conservées dans leurs récipients d'origine dans une zone désignée.
- L'équipement et la verrerie de laboratoire susceptibles d'avoir été contaminés doivent être isolés afin d'éviter une contamination croisée par différents radio-isotopes.
- Toute fuite radioactive doit être immédiatement corrigée conformément aux procédures établies.

- Toutes les matières radioactives doivent être éliminées conformément aux réglementations en vigueur et aux directives des autorités ayant compétence sur le laboratoire.

Pour plus d'informations, consulter la fiche de données de sécurité (FDS).

XVII. BIBLIOGRAPHIE

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

XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	Décompte total	NSB	Étalon (0)	Étalons (1-6)	Contrôles	Échantillons
Tampon de dosage	-	600 µL	400 µL	-	-	-
Étalons	-	-	-	400 µL	-	-
Contrôles	-	-	-		400 µL	-
Échantillons	-	-	-		-	400 µL
Antisérum	-	-	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Mélanger au vortex et incuber pendant 6 heures entre 2 et 8 °C						
Traceur marqué à l'iode ¹²⁵						200 µL
Mélanger au vortex et incuber pendant 18-22 heures entre 2 et 8 °C						
Phase solide à double anticorps	-					100 µL
Mélanger au vortex et incuber pendant 30 à 60 min entre 2 et 8 °C						
Mélanger au vortex et centrifuger pendant 15 minutes (1 700 g) à 4 °C						
Décanter ou aspirer le surnageant, et compter la radioactivité des résidus.						

D'autres traductions de cette notice peuvent être téléchargées de notre site Internet : <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lea todo el protocolo antes de usar.

Angiotensin II – RIA

I. INDICACIONES

Radioinmunoensayo para la medición cuantitativa *in vitro* de angiotensina-II en plasma.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre comercial: DIAsource Angiotensin II-RIA
- B. Número de catálogo: RB320: 100 pruebas
- C. Fabricado por: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

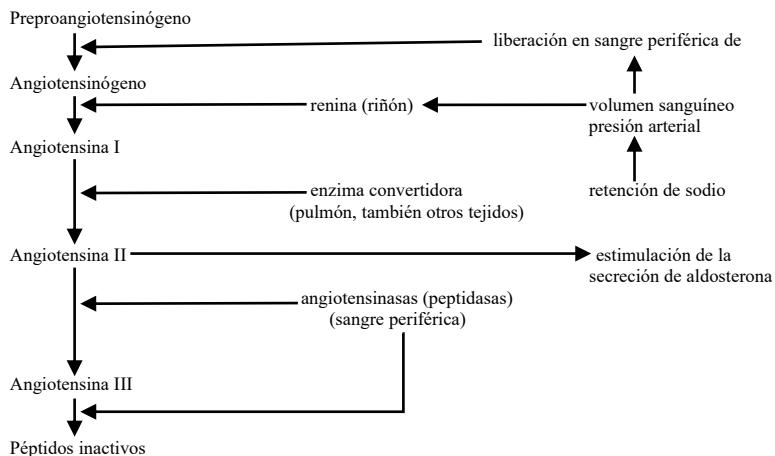
Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con:

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

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

1. Actividades biológicas

La angiotensina II es el producto biológicamente activo del sistema renina-angiotensina (1,2). El octapéptido angiotensina II (peso molecular 1046) es el vasoconstrictor fisiológico más potente conocido. A partir de un precursor proteico de gran tamaño (preproangiotensinógeno) sintetizado en el hígado, se libera en una serie de procesos proteolíticos catalizados por enzimas de diversos tejidos (1, 2 4). La angiotensina II tiene una vida muy corta en el plasma: Una vez generada a partir de la angiotensina I, es degradada posteriormente en péptidos fisiológicamente inactivos por diversas peptidasas plasmáticas, con una semivida plasmática inferior a un minuto (5). El esquema que aparece a continuación ofrece una idea del denominado sistema renina-angiotensina:



2. Aplicaciones clínicas

Debido a que la generación de angiotensina II a partir del angiotensinógeno a través de la angiotensina I se ve muy afectada por los cambios en la actividad de la renina, se debe tener muy en cuenta todos los factores externos que influyen en la actividad de la renina: la actividad de la renina aumenta durante el embarazo, después de la disminución del sodio, estar en posición erguida y bajo la influencia de una serie de fármacos, como los anticonceptivos orales, la adrenalina, los vasodilatadores antihipertensivos, los diuréticos, las dosis elevadas de espironalactona y progesterona. Los factores que disminuyen la actividad de la renina son: estar en posición horizontal, el aumento de la absorción de sodio, la a-metil-DOPA, la L-DOPA, el propranolol, la reserpina, la clomidina y la vejez. La actividad de la renina también está sujeta a un ritmo diurno con concentraciones máximas por la mañana. El radioinmunoensayo de angiotensina II tiene su aplicación establecida en el tratamiento y seguimiento de la hipertensión.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Después de la extracción de las muestras de plasma, la angiotensina II se analiza mediante un radioinmunoensayo competitivo. Este radioinmunoensayo utiliza un antisero de antiangiotensina II de conejo y un trazador radioyodado de angiotensina II. Las fases ligadas y libres se separan mediante un segundo anticuerpo ligado a partículas de fase sólida, realizándose después un paso de centrifugación. Se mide la radiactividad en las fracciones ligadas y se puede generar una curva de calibración típica.

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit con 100 pruebas	Código de color	Reconstitución
[Ab] Antisuero: Antisuero de conejo antiangiotensina II	1 vial Liofilizado	Azul	Añadir 22 ml de agua destilada
Ag ¹²⁵I TRAZADOR: ¹²⁵ I-Angiotensina II marcada con yodo en tampón fosfato con albúmina de suero humano y NaN ₃ .	1 vial Liofilizado 56 kBq	Rojo	Añadir 25 ml de agua destilada
[DASP] Fase sólida de doble anticuerpo: de cabra anti-Ig de conejo ligado a fase sólida en tampón fosfato con albúmina de suero humano, Tween y azida sódica. (<0,1 %).	1 vial 11 ml	Verde	Listo para usar
[ASS BUF] Tampón de ensayo : tampón fosfato que contiene albúmina de suero humano y azida sódica, (<0,1 %).	2 viales 50 ml	Negro	Listo para usar
[CAL] Calibrador de angiotensina II, 300 pmol/l. (Véase el valor exacto en la etiqueta del vial)	1 vial Liofilizado	Amarillo	Reconstituya con agua destilada en el volumen indicado en la etiqueta del vial
[CONTROL N] Controles - N = 1 o 2 (Véase el valor exacto en la etiqueta del vial)	2 viales Liofilizado	Plata	Añadir 2 ml de agua destilada

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

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

1. Pipetas (100 µl, 200 µl, 1 ml, 2 ml, 5 ml).
2. Dosificadores de repetición (100 µl, 200 µl).
3. Probeta de medición 25 ml.
4. Tubos de poliestireno, polipropileno o vidrio.
5. Vortex.
6. Centrífuga refrigerada.
7. Etanol p.A. 98 %.
8. Concentrador al vacío o N₂ (nitrógeno).
9. Baño de hielo

VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

PREPARE TODOS LOS REACTIVOS 15 MINUTOS ANTES DE SU USO

- A. **Antisuero:** Reconstruya con 22 ml de agua destilada. Mezcle suavemente. Estable a -20 °C durante al menos 3 meses después de la reconstitución
- B. **¹²⁵I-angiotensina II :** Reconstruya con 25 ml de agua destilada. Mezcle suavemente. Estable a -20 °C hasta la fecha de caducidad.

- C. **Fase sólida de doble anticuerpo:** Lista para usar. El reactivo de separación debe colocarse en un agitador magnético durante 10 minutos. Es posible pipetejar el reactivo con un dosificador de repetición. Estable a 2-8 °C.
- D. **Tampón de ensayo:** Lista para usar. Estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad.
- E. **Calibrador de angiotensina II 300 pmol/l:** Reconstruya con agua destilada en el volumen indicado en la etiqueta del vial. Mezcle suavemente. Estable a -20 °C durante al menos 3 meses después de la reconstitución. Consulte la tabla de la sección X. B. para preparar de la curva de calibración.
- F. **Controles:** Reconstruya cada vial con 2 ml de agua destilada. Estable a -20 °C durante al menos 3 meses después de la reconstitución. La concentración del control figura en la etiqueta de los viales (sin extracción).

VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

Este kit es estable hasta la fecha de caducidad indicada si se conserva como se especifica.

Una vez recibido el kit, todos los reactivos deben conservarse a 2-8 °C. Los reactivos reconstituidos deben almacenarse de acuerdo con la sección VII. Los reactivos reconstituidos son estables según la sección VII, pero no más allá de la fecha de caducidad.

IX. RECOGIDA DE MUESTRAS

Se recomienda una homogeneización cuidadosa de la preparación del paciente y de las condiciones de obtención de la muestra. Debido a la extrema inestabilidad de la angiotensina II en el fluido biológico, se debe tener mucho cuidado para garantizar que la muestra de sangre se recoja correctamente:

- Extraiga sangre del paciente en ayunas y en posición recostada en un tubo en frío que contenga EDTA;
- centrifugue inmediatamente a 4 °C para separar el plasma;
- congele inmediatamente la muestra en tubos de plástico a -20 °C hasta su análisis.

X. PROCEDIMIENTO

A. Procedimiento de extracción del plasma

1. Etiquete un tubo de extracción para cada muestra de paciente. Etiquete un tubo adicional (R) para estimar la recuperación de la extracción.
2. Coloque los tubos de extracción y el etanol en hielo.
3. Pipete 1 ml de cada muestra en los tubos de extracción debidamente etiquetados.
- NO EXTRAIGA LOS CALIBRADORES Y CONTROLES.
4. Prepare un tubo de estimación de la recuperación (R):
- Pipete 1 ml de una muestra de plasma al azar en el tubo de recuperación (R). La muestra utilizada para este ensayo de recuperación debe tener una matriz proteica similar a la de las muestras analizadas.
- Añada 200 µl de trazador de ¹²⁵I-angiotensina II en el tubo (R).
- Extraiga esta muestra junto con las muestras del paso 6.
5. Prepare los tubos de Recuperación Total (TR) :
- Pipete 200 µl de trazador de ¹²⁵I-angiotensina II en dos tubos (TR).
- Añada 200 µl de tampón de ensayo y mezcle.
- Tape y aparte estos tubos para contabilizarlos en el cálculo de la recuperación.
6. Añada 4 ml de etanol enfriado a cada tubo de muestra y recuperación (R).
7. Mezcle y agite durante 2 minutos.
8. Centrifugue todos los tubos de extracción a 2000 g, durante 15 minutos a 4 °C.
9. Decante el sobrenadante de cada tubo de extracción en tubos de 16 x 100 mm previamente preparados, limpios y debidamente etiquetados.
10. Evapore los sobrenadantes bajo una corriente de nitrógeno hasta que se sequen (a 37 °C como máximo).
11. Reconstituya las muestras secas añadiendo 1 ml de tampón de ensayo y agite a fondo.
12. Proceda inmediatamente con el procedimiento RIA o almacene las muestras extraídas a -20 °C hasta dos semanas antes de utilizarlas en el ensayo.
13. Reconstituya la muestra de recuperación seca (R) añadiendo 1 ml de tampón de ensayo y agite a fondo en el vórtex.
14. Pipete 400 µl del tubo de muestra de recuperación reconstituido (R) en dos tubos de 12 x 75 mm.
15. Realice la cuenta en los tubos de recuperación total (TR) y de recuperación (R) durante al menos dos minutos en un contador gamma.

Cálculo de recuperación:

Calcule el % de recuperación dividiendo los cpm en los tubos de recuperación (R) por los cpm en los tubos de recuperación total (TR) y multiplique por 1,0/0,4:

$$\% \text{ de recuperación: } \frac{\text{tubo de recuperación de cpm (R)}}{\text{Tubo de recuperación total (TR)}} \times 100$$

B. Preparación de las soluciones del calibrador

Dilución	Calibrador de Angiotensina II	Concentración 300 pmol/l
1000 µl de calibrador de Angio II + 1000 µl de tampón de ensayo. Vórtex	Calibrador a	150 pmol/l
1000 µl de calibrador a + 1000 µl de tampón de ensayo. Vórtex	Calibrador b	75 pmol/l
1000 µl de calibrador b + 1000 µl de tampón de ensayo. Vórtex	Calibrador c	37,5 pmol/l
1000 µl de calibrador c + 1000 µl de tampón de ensayo. Vórtex	Calibrador d	18,8 pmol/l
1000 µl de calibrador d + 1000 µl de tampón de ensayo. Vórtex	Calibrador e	9,4 pmol/l
1000 µl de calibrador e + 1000 µl tampón de ensayo. Vórtex	Calibrador f	4,7 pmol/l

C. Procedimiento del ensayo

- Mantenga los tubos de ensayo y los reactivos en un baño de hielo durante todos los pasos de pipeteo.
- Pipetee 400 µl de cada calibrador, 400 µl de los controles y 400 µl de cada extracto de plasma por duplicado en los correspondientes tubos de poliestireno etiquetados.
- Añada 400 µl de tampón de ensayo hasta la fijación máxima de los tubos (0 pmol/l).
- Añada 600 µl de tampón de ensayo a los tubos NSB (blanco).
- Añada 200 µl de antisuero de angiotensina II en cada tubo, excepto en los tubos blanco y tubos TC.
- Mezcle en el vórtex e incube durante 6 horas a 2-8 °C.
- Añada 200 µl de trazador ¹²⁵I-angiotensina II en todos los tubos.
- Agite en vórtex todos los tubos e incube a 2-8 °C durante 18-22 horas.
- Mientras se agita continuamente, añada 100 µl de fase sólida de doble anticuerpo a todos los tubos, excepto a los tubos TC.
- Mezcle en el vórtex e incube durante 30-60 minutos a 2-8 °C.
- Centrifugue todos los tubos durante 15 minutos a 1700 g a 4 °C.
- Decante los sobrenadantes con cuidado.
- Cunte los residuos durante 1-2 minutos.

XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- Reste la tasa de recuento media (cpm) del NSB de la tasa de recuento media (cpm) de las réplicas de calibradores, controles y muestras de pacientes.
- Puede generarse una curva de calibración trazando cpm, % B/Bo o %B/T de la fracción ligada precipitada, frente a la concentración de los calibradores de angiotensina II.
- Para obtener la concentración de angiotensina II en las muestras extraídas de pacientes y controles, se interpolan ahora sus cpm, % B/Bo o B/T de fracciones ligadas precipitadas a partir de la curva de calibración generada.
- La curva de calibración también se puede elaborar mediante métodos informáticos. Para la reducción automatizada de datos, se pueden utilizar los métodos logit/log y Spline.
- Corrija los valores plasmáticos para el % de recuperación de la extracción.

Por ejemplo:

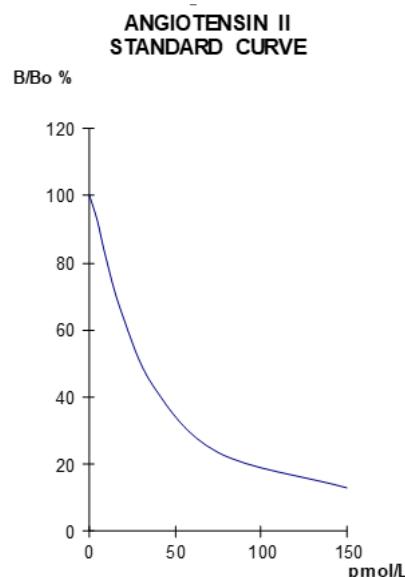
Concentración de la muestra del paciente medida a partir de la curva: 20 pmol/l
Recuperación de la extracción medida después de la extracción: 65 %
Concentración de la muestra del paciente corregida: $\frac{20 \times 100}{65} = 30,8 \text{ pmol/l}$

65

Datos de la curva de calibración

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

Ejemplo de curva de calibración



XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

A. Sensibilidad

La sensibilidad juzgada como 3 desviaciones estándar de cambio del calibrador cero es de 2,0 pmol/l.

B. Precisión

Dentro de la misma serie					Dentro de distintas series				
	n	16,4 pmol/l	DE	% CV		n	16,4 pmol/l	DE	% CV
muestra A	20	13,3	0,44	3,3	muestra A	6	11,6	0,55	4,8
Muestra B	20	64,9	1,97	3,0	Muestra B	6	60,9	2,4	3,9

C. Exactitud

Recuperación			
Cuatro muestras diferentes con diferentes cantidades de calibrador de angiotensina II			
Muestra	Conc. esperada: (pmol/l)	Conc. observada (pmol/L)	% Recuperación
A1	12,4	12,3	99,2
A2	23,9	23,5	96,8
A3	27,2	22,0	103,0
A4	46,0	51,1	111,0

B. Especificidad

El antisuero de la angiotensina II se obtiene de conejos. Se midieron las siguientes reactividades cruzadas al 50 % B/Bo.

Péptido	Reactividad cruzada
Angiotensina II	100
Angiotensina I	<0,1
Leu Heptapeptido	100
Angiotensina II Asn ¹ -Val ⁵	30
Angiotensina II Sar ¹ -Ile ⁸	100
Angiotensina III	80

E. Interferencia

Las muestras que presenten turbidez, hemólisis, hiperlipemia o que contengan fibrina pueden dar resultados inexactos.

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Se deben realizar controles en cada ensayo. El kit incluye dos controles, cuyo valor (sin procedimiento de extracción) se indica en las etiquetas de los viales. Para supervisar la exactitud y precisión de los reactivos y las técnicas, utilice los controles recomendados por el fabricante del plasma de control y de acuerdo con las prácticas de los laboratorios de referencia.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo normal de valores esperados. Se extrajeron muestras de sangre de 11 adultos aparentemente sanos (09.00 - 10.00 a.m.) y se determinaron los niveles de angiotensina II.

Intervalo observado: 19 - 38 pmol/l

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

Se analizaron los materiales derivados de sangre humana y utilizados en la preparación de este kit y resultaron negativos para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos contra el VHC y anticuerpos contra el VIH-1 y el VIH-2. No obstante, trate todos los componentes como una posible fuente de infección.

Los reactivos de este kit contienen azida sódica. El contacto con tubos de desagüe de cobre o plomo puede dar lugar a la formación acumulada de depósitos de azida altamente explosivos. Al desechar los reactivos en el alcantarillado, se debe lavar siempre con abundante agua, lo que evita la formación de azida metálica. Las placas sospechosas de estar contaminadas con estos depósitos explosivos deben limpiarse a fondo con una solución de hidróxido de sodio al 10 %.

Este kit contiene I¹²⁵ (semivida: 60 días), que emite radiaciones ionizantes X (28 keV) y γ (35,5 keV). Sólo médicos, laboratorios clínicos u hospitales pueden recibir, adquirir, poseer y utilizar el material radiactivo incluido para pruebas clínicas *in vitro* o de laboratorio que no impliquen la administración interna o externa del material, o de la radiación del mismo, a seres humanos o animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia están sujetos a la normativa de cada país.

El cumplimiento de las normas básicas sobre seguridad radiológica debe proporcionar la protección adecuada.

- No coma, beba, fume ni utilice productos cosméticos donde se vaya a utilizar materiales radioactivos.
- No pipeteé soluciones radiactivas por vía oral.
- Evite el contacto directo con todos los materiales radiactivos mediante el uso de artículos de protección tales como batas de laboratorio y guantes desechables.
- Todos los trabajos radiológicos deben realizarse en un área designada.
- Los materiales radiactivos deben almacenarse en los contenedores originales en un área designada.
- Los equipos y el material de vidrio de laboratorio, que están expuestos a contaminación, deben separarse para prevenir la contaminación cruzada de radioisótopos diferentes.
- Cualquier vertido radiactivo debe ser atendido inmediatamente de acuerdo con los procedimientos establecidos.
- Todos los materiales radiactivos deben eliminarse de acuerdo con las normativas y directrices vigentes de los organismos con jurisdicción sobre el laboratorio.

Para obtener más información, consulte la ficha de datos de seguridad (FDS).

XVII. BIBLIOGRAFÍA

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

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	Recuento total	NSB	Calibrador (0)	Calibradores (1-6)	Controles	Muestras
Tampón de ensayo	-	600 µl	400 µl	-	-	-
Calibradores	-	-	-	400 µl	-	-
Controles	-	-	-		400 µl	-
Muestras	-	-	-		-	400 µl
Antisuero	-	-	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Mezcle en el vórtex e incube durante 6 horas a 2-8 °C.

Trazador 125I	200 µl
---------------	--------

Mezcle en el vórtex e incube durante 18-22 horas a 2-8 °C.

Fase sólida de doble Ab	-	100 µl
-------------------------	---	--------

Mezcle en el vórtex e incube durante 30-60 minutos a 2-8 °C.

Mezcle en el vórtex y centrifugue durante 15 min (1700 g) a 4 °C

Decante o aspire el sobrenadante y cuente la radiactividad del residuo.

Otras traducciones de estas instrucciones de uso disponibles para su descarga en nuestra página web: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Před použitím si přečtěte celý protokol.

Angiotenzin II – RIA

I. ZAMÝŠLENÉ POUŽITÍ

Radioimunoanalýza pro kvantitativní měření Angiotenzinu II v plazmě *in vitro*

II. VŠEOBECNÉ INFORMACE

- A. Patentovaný název: DIAsource Angiotensin II-RIA
- B. Katalogové číslo: RB320: 100 testů
- C. Výrobce: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgie.

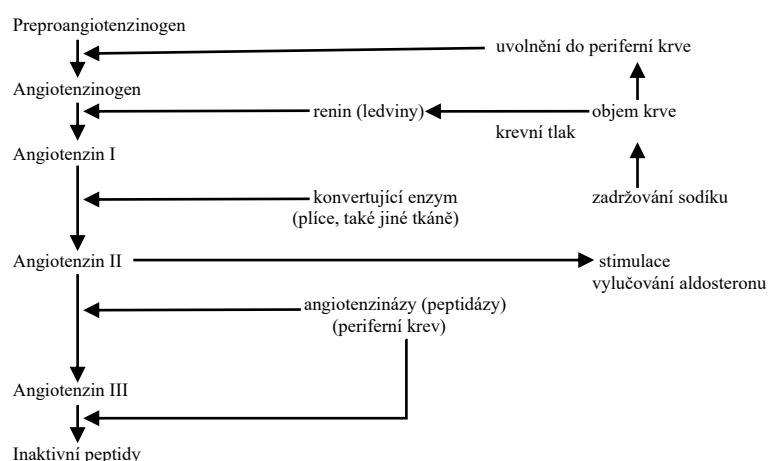
Ohledně technické pomoci nebo informací pro objednání kontaktujte:
Tel.: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. KLINICKÉ POZADÍ

1. Biologické aktivity

Angiotenzin II je biologicky aktivní produkt renin-angiotenzinového systému (1,2).

Oktapeptid angiotenzin II (molekulární hmotnost 1046) je nejsilnější známý fyziologický vazokonstriktor. Z velkého proteinového prekurzoru (pre-proangiotenzinogen) syntetizovaného v játrech se uvolňuje řadou proteolytických kroků katalyzovaný pomocí enzymů z různých tkání (1, 2-4). Angiotenzin II má v plazmě velmi krátkou životnost: Po vygenerování z angiotenzinu I se dále rozkládá na fyziologicky inaktivní peptidy pomocí různých plazma peptidáz, v plazmě poločas rozpadu méně než minutu (5). Následující obrázek zobrazuje schéma takzvaného renin-angiotenzinového systému:



2. Klinické použití

Jelikož je tvorba angiotenzinu II z angiotenzinogenu přes angiotenzinu I je silně ovlivněna změnami aktivity reninu, je třeba pečlivě zvážit veškeré vnější faktory ovlivňující aktivitu reninu: aktivita reninu je zvýšena během těhotenství, po úbytku sodíku, ve vzpřímené poloze a pod vlivem široké škály léků, např. orálně užívané antikoncepcie, adrenalín, antihypertenzinové vazodilatátory, diuretiky, vysokých dávek spironolaktonu a progesteronu. Faktory snižující aktivitu reninu jsou: vodorovná poloha, zvýšená absorce sodíku, a-methyl-DOPA, L-DOPA, propranolol, reserpín, klonidin a vysoký věk. Aktivita reninu rovněž závisí na denním rytmu s nejvyššími hodnotami ráno. Radioimunoanalýza angiotenzinu II má své stanovené použití v léčbě a monitorování hypertenze.

IV. PRINCIPY METODY

Po odebrání vzorků plazmy je angiotenzin II analyzován kompetitivní radioimunoanalýzou. Tato radioimunoanalýza využívá králičí antisérum anti-angiotenzinu II a radio-jodovaný indikátor angiotenzinu II. Vázанé a volné fáze se separují druhou protifázkou vázanou na částice pevné fáze, a pak krokem odstředování. Změří se radioaktivita ve vázaných frakcích a lze vygenerovat běžnou kalibrační křivku.

V. DODÁVANÁ ČINIDLA

Činidla	Sada 100 testů	Barevný kód	Rekonstituce
[Ab] Antisérum: Králičí antisérum anti-angiotenzin II	1 lahvička Lyofilizovaný	Modrý	Přidejte 22 ml destilované vody
Ag 125I INDIKÁTOR: ¹²⁵ I Jódem značený Angiotensin II ve fosfátovém pufru s lidským sérovým albuminem a NaN ₃ .	1 lahvička Lyofilizované 56 kBq	Červený	Přidejte 25 ml destilované vody
[DASP] Dvojitá protilátká pevné fáze Kozí anti-králičí Ig vázané na pevnou fázi ve fosfátovém pufru s lidským sérovým albuminem, Tween a azid sodný. (<0,1 %).	1 lahvička 11 ml	Zelený	Připraveno k použití
[ASS BUF] Testovací pufr: fosfátový pufr obsahující lidský sérový albumin a azid sodný, (<0,1 %).	2 lahvičky 50 ml	Černý	Připraveno k použití
[CAL] Kalibrátor Angiotenzinu II, 300 pmol/l. (viz přesná hodnota na štítku lahvičky)	1 lahvička Lyofilizovaný	Žlutý	Rekonstituuje destilovanou vodou v objemu uvedeném na štítku lahvičky
[CONTROL N] Kontroly – N = 1 nebo 2 (viz přesná hodnota na štítku lahvičky)	2 lahvičky Lyofilizovaný	Stříbrný	Přidejte 2 ml destilované vody

VL. MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ

Následující materiál je nezbytný, ale není součástí sady:

1. Pipety (100 µl, 200 µl, 1 ml, 2 ml, 5 ml).
 2. Opakovací dávkovače (100 µl, 200 µl).
 3. Odměrný válec 25 ml.
 4. Polystyrenové zkumavky, polypropylenové nebo skleněné zkumavky.
 5. Třepáčka.
 6. Chlazená odstředivka.
 7. Etanol p.A. 98 %.
 8. Vakuový koncentrátor nebo N₂ (dusík).
 9. Ledová lázeň

VII. PŘÍPRAVA ČINIDLA

VŠECHNA ČINIDLA PŘIPRAVTE 15 MINUT PŘED POUŽITÍM!

- A. Antisérum:** Rekonstituujte s 22 ml destilované vody. Opatrně smíchejte.

Stabilní při -20 °C alespoň po dobu 3 měsíců po rekonstituci

B. ¹²⁵I-angiotenzin II: Rekonstituujte s 25 ml destilované vody. Opatrně smíchejte. Stabilní při -20 °C do data expirace.

C. Dvojitá protílátka pevné fáze: Připraveno k použití. Separační činidlo je nutno vložit na magnetický promíchávač na 10 minut. Činidlo je možno pipetovat pomocí opakovacího dávkovače. Stabilní při 2-8 °C.

- D. **Testovací pufr:** Připraveno k použití. Stabilní při 2-8 °C do data expirace.
 - E. **Kalibrátor Angiotenzinu II 300 pmol/l:** Rekonstituujte destilovanou vodou v objemu uvedeném na štítku lahvičky. Opatrně smíchejte. Stabilní při -20 °C alespoň po dobu 3 měsíců po rekonstituci. Přípravu kalibrační křivky najdete v tabulce v oddíle X. B.
 - F. **Kontroly:** Rekonstituujte každou lahvičku s 2 ml destilované vody. Stabilní při -20 °C alespoň po dobu 3 měsíců po rekonstituci. Koncentrace kontrolního roztoku je uvedena na štítku lahviček (bez extrakce).

VIII. SKLADOVÁNÍ A DATA EXSPIRACE ČINIDELOU

Tato sada je stabilní až do uvedeného data expirace při skladování ve stanovených podmínkách.

Po obdržení sady uskladněte všechna činidla při 2-8 °C.

Rekonstituovaná činidla je třeba skladovat v souladu s oddílem VII. Rekonstituovaná činidla jsou stabilní podle oddílu VII, ale nejdéle do data expirace.

IX *SBĚR VZORKŮ*

Doporučujeme pečlivou standardizaci přípravy pacienta a podmínek odběru vzorků. Z důvodu extrémní lability angiotenzinu II v biologických tekutinách, je nutno postupovat při správném odběru krevního vzorku velmi opatrně:

- krev odeberete pacientovi na lačno v ležící poloze do studené zkumavky s EDTA;
 - okamžitě odstřeďujte při 4 °C a oddělte plazmu;
 - vzorek okamžitě zmrazte v plastových zkumavkách při -20 °C až do testování.

X. POSTUP

A. Postup extrakce plazmy

- I. Postup extrakce plazmy**

 - Označte jednu odběrovou zkumavku na každý vzorek pacienta. Označte jednu další zkumavku (R) za účelem odhadu obnovy extrakce.
 - Umístejte extrakční zkumavky a etanol na led.
 - Pipetou naberte 1 ml každého vzorku do rádně označených extrakčních zkumavek.
 - NEEXTRAHUJTE KALIBRÁTORY A KONTROLY.**
 - Připravte zkumavku pro odhad obnovy (R):
 - Pipetou naberte 1 ml náhodného vzorku plazmy do zkumavky pro obnovu (R). Vzorek použitý pro tento test obnovy by měl mít proteinovou matrici obdobnou s testovanými vzorky.
 - Přidejte 200 μL ^{125}I -indikátoru I-angiotenzinu II do zkumavky (R).
 - Extrahuje tento vzorek spolu se vzorky v kroku 6.
 - Připravte zkumavky celkové obnovy (TR) :
 - Pipetou naberte 200 μL ^{125}I -indikátoru I-angiotenzinu II do dvou zkumavek (TR).
 - Přidejte 200 μL testovacího pufra a smíchejte.
 - Zavíčkujte a odložte tyto zkumavky stranou před započítáním pro výpočet obnovy.
 - Přidejte 4 ml chlazeného etanolu do každého vzorku a do zkumavky pro obnovu (R).
 - Po dobu 2 minut míchejte a protřepávejte.
 - Všechny extrakční zkumavky odstředíte na 2000 g po dobu 15 minut při 4 °C.
 - Supernatant scedte z každé extrakční zkumavky do předem připravených čistých a rádně označených zkumavek 16 x 100 mm.
 - Supernatanty odpařujte v páře dusíku do vysušení (při max. 37 °C).
 - Vysušené vzorky rekonstituujte přidáním 1 ml testovacího pufra a důkladně protřepejte.
 - Prověďte okamžitě postup RIA nebo uskladněte extrahované vzorky při - 20 °C až na dva týdny před jejich použitím v testu.
 - Vysušený vzorek pro obnovu (R) rekonstituujte přidáním 1 ml testovacího pufra a důkladně protřepejte.
 - Pipetou naberte 400 μL ze zkumavky s rekonstituovaným vzorkem pro obnovu (R) do dvou zkumavek 12 x 75 mm.
 - Počítejte zkumavky pro celkovou obnovu (TR) a obnovu (R) po dobu alespoň dvou minut v čítači gama.

Výpočet obnovy:

Vypočet obnovy:
Vypočtěte % obnovy vydělením cpm ve zkumavkách pro obnovu (R) hodnotou cpm ve zkumavkách pro celkovou obnovu (TR) a vynásobte 1,0/0,4:

% obnovy: cpm zkumavky pro obnovu (R) 1,0 x 100
cpm zkumavky pro celkovou obnovu (TR) 0,4

B. Příprava kalibračních roztoků

Ředění	Kalibrátor Angiotenzinu II	Koncentrace 300 pmol/l
1000 µL Angie II kalibrátoru + 1000 µL testovací pufr. Třepačka	Kalibrátor a	150 pmol/l
1000 µL kalibrátoru a + 1000 µL testovací pufr. Třepačka	Kalibrátor b	75 pmol/l
1000 µL kalibrátoru b + 1000 µL testovací pufr. Třepačka	Kalibrátor c	37,5 pmol/l
1000 µL kalibrátoru c + 1000 µL testovací pufr. Třepačka	Kalibrátor d	18,8 pmol/l
1000 µL kalibrátoru d + 1000 µL testovací pufr. Třepačka	Kalibrátor e	9,4 pmol/l
1000 µL kalibrátoru e + 1000 µL testovací pufr. Třepačka	Kalibrátor f	4,7 pmol/l

C. Testovací postup

- Testovací zkumavky a činidla uschovějte v ledové lázni během všech pipetovacích kroků.
- Pipetujte 400 µL každého kalibrátoru, 400 µL kontrolních roztoků a 400 µL každého vzorku plazmy duplicitně do odpovídajících označených polystyrenových zkumavek.
- Přidejte 400 µL testovacího pufru do max. vázacích zkumavek (0 pmol/L).
- Přidejte 600 µL testovacího pufru do zkumavek NSB (prázdných).
- Přidejte 200 µL antiséra Angiotenzinu II do každé zkumavky vyjma prázdných a TC zkumavek.
- Protřepejte a inkubujte 6 hodin při 2-8 °C.
- Přidejte 200 µL ¹²⁵I-indikátoru I-Angiotenzinu II do všech zkumavek.
- Protřepejte všechny zkumavky a inkubujte při teplotě 2-8 °C po dobu 18-22 hodin.
- Za stálého míchání přidejte 100 µL dvojitě protilátky pevné fáze do všech zkumavek vyjma zkumavek TC.
- Protřepejte a inkubujte 30-60 minut při 2-8 °C.
- Odstřed'ujte všechny zkumavky 15 minut při 1700 g a teplotě 4 °C.
- Supernatanty opatrně sced'te.
- Počítejte zbytek po dobu 1-2 minut.

XI. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

- Odečtěte střední počet (cpm) NSB od středního počtu (cpm) replikátů kalibrátorů, kontrol a vzorků od pacientů.
- Kalibrační křivku lze generovat zanesením cpm, % B/Bo nebo % B/T vysrážené vázané frakce vůči koncentraci kalibrátorů Angiotenzinu II.
- Aby bylo možno získat koncentraci Angiotenzinu II v extrahovaných pacientských vzorcích a kontrolních roztocích, jejich cpm, % B/Bo nebo B/T vysrážených vázaných frakcí se nyní interpolují z vygenerované kalibrační křivky.
- Kalibrační křivku lze také konstruovat výpočetními metodami. U automatizované redukce dat lze použít metody logit/log i Spline.
- Správné hodnoty plazmy pro % obnovu extrakce.

Například:

Koncentrace pacientského vzorku měřená z křivky: 20 pmol/l

Obnova extrakce měřená po extrakci: 65 %

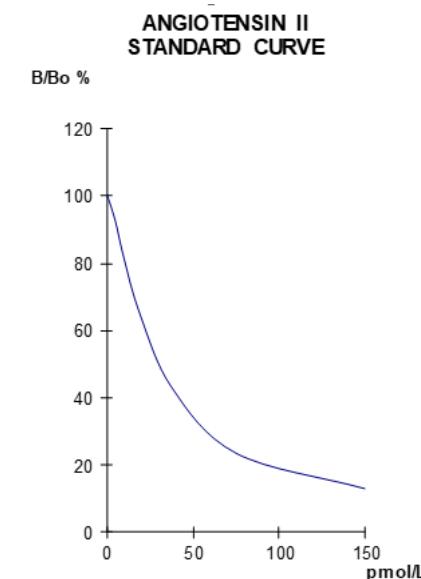
Opravená koncentrace pacientského vzorku: $\frac{20 \times 100}{65} = 30,8 \text{ pmol/l}$

65

Data kalibrační křivky

	Průměr cpm	Opraveno cpm	% B/Bo	Výsledky (pmol/l)
Celkové počty	18582			
NSB	678			
Kalibrátor 0 pmol/l	9559	8881	100	
Kalibrátor f 4,7 pmol/l	8880	8202	92,4	
Kalibrátor e 9,4 pmol/l	7957	7279	82,0	
Kalibrátor d 18,8 pmol/l	7039	5781	65,1	
Kalibrátor c 37,5 pmol/l	4508	3830	43,1	
Kalibrátor b 75 pmol/l	2770	2099	23,6	
Kalibrátor a 150 pmol/l	1846	1168	13,1	
Kontrola nízká	7359	6681	75,2	13,1
Kontrola vysoká	3145	2467	27,8	63,1

Příklad kalibrační křivky



XIII. ÚČINNOST A OMEZENÍ

A. Citlivost

Citlivost posouzena jako 3 změny standardní odchylky od nulového kalibrátoru je 2,0 pmol/l.

B. Přesnost

V rámci postupu					Mezi postupy				
	n	Střed pmol/l	SD	% CV		n	Střed pmol/l	SD	% CV
vzorek A	20	13,3	0,44	3,3	vzorek A	6	11,6	0,55	4,8
vzorek B	20	64,9	1,97	3,0	vzorek B	6	60,9	2,4	3,9

C. Přesnost

Obnova			
Čtyři různé vzorky jsou s přídavkem různého množství kalibrátoru Angiotenzinu II			
vzorek	Očekávaná konc. (pmol/l)	Zjištěná konc. (pmol/l)	% Obnova
A1	12,4	12,3	99,2
A2	23,9	23,5	96,8
A3	27,2	22,0	103,0
A4	46,0	51,1	111,0

D. Specificita

Antisérum angiotenzinu II se pěstuje v králících. Následující zkřížená reaktivita byla naměřena při 50 % B/Bo.

Peptid Zkřížená reakce

Angiotenzin II	100
Angiotenzin I	<0,1
Leu-Heptapeptid	100
Asn ¹ -Val ⁵ Angiotenzin II	30
Sar ¹ Ile ⁸ Angiotenzin II	100
Angiotenzin III	80

E. Interference

Vzorky se známkami zakalení, hemolýzy, hyperlipémie nebo obsahující fibrin mohou vykazovat nepřesné výsledky.

XIV. INTERNÍ KONTROLA KVALITY

Při každém testovacím postupu je třeba provést kontroly. Dvě kontroly jsou součástí sady, hodnota (bez procesu extrakce) je uvedena na štítcích lahviček. Kontroly používejte v souladu s doporučením výrobce kontrolní plazmy a v souladu s referenčními laboratorními postupy pro monitorování přesnosti a spolehlivosti činidel i technik.

XV. REFERENČNÍ INTERVALY

Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní běžný rozsah očekávaných hodnot. Vzorky krve byly odebrány od 11 zjevně zdravých dospělých osob (09:00 - 10:00) a byly určeny hodnoty Angiotenzinu II.

Zjištěný rozsah: 19 - 38 pmol/l

XVI. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A VAROVÁNÍ

Bezpečnost

Pouze pro diagnostiku in vitro.

Materiály odvozené od lidské krve a použité při přípravě této sady byly otestovány a byly shledány negativními na povrchový antigen viru hepatitidy B (HBsAg), protilaterky vůči HCV a protilaterky vůči HIV-1 a HIV-2. Se všemi složkami nicméně manipulujte jako s možným zdrojem nákazy.

Činidla v této sadě obsahují azid sodný. Kontakt s měděnými nebo olověnými trubkami může vést ke kumulativní tvorbě vysoko výbušných usazenin azidu. Při likvidaci činidel do kanalizace je vždy spláchněte velkým množstvím vody, čímž zabráníte tvorbě kovového azidu. Instalace s podezřením na kontaminaci těmito výbušnými usazeninami je nutno důkladně vyčistit s použitím 10 % roztoku hydroxidu sodného.

Tato sada obsahuje ^{125}I (poločas: 60 dní) vysílající ionizační záření X (28 keV) a γ (35.5 keV). Přijímat obsažený radioaktivní materiál, získávat jej, vlastnit a používat smějí pouze lékaři, klinické laboratoře nebo nemocnice pro klinické nebo laboratorní testy in vitro bez interního nebo externího podání materiálu nebo jeho záření lidem nebo živočichům. Příjem, pořízení, držení, používání a převod se řídí předpisy v každé zemi.

Dodržováním základních pravidel pro radiační bezpečnost zajistíte dostatečnou ochranu.

- V místech manipulace s radioaktivním materiélem nejezte, nepijete, nekuřte a nepracujte s kosmetickými přípravky.
- Radioaktivní roztoky nepipetujte ústy.
- Zabraňte přímému kontaktu s radioaktivními materiály pomocí ochranných prostředků, jako jsou laboratorní pláště a jednorázové rukavice.
- Veškeré radiologické práce je třeba provádět ve vyhrazené oblasti.
- Radioaktivní materiály skladujte v původních nádobách na vyhrazeném místě.
- Laboratorní zařízení a skleněné pomůcky vystavené kontaminaci je nutno segregovat, aby se zabránilo zkřížené kontaminaci různými radio-izotopy.
- Jakýkoli únik radioaktivní látky je nutno okamžitě zlikvidovat v souladu se stanovenými postupy.
- Veškerý radioaktivní materiál je nutno zlikvidovat v souladu s převažujícími předpisy a pokyny orgánů vykonávajících dohled nad laboratořemi.

Další informace jsou k dispozici v bezpečnostním listu (BL).

XVII. LITERATURA

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

XVIII. SHRNUTÍ PROTOKOLU

	Celko vý počet	NSB	Kalibrátor (0)	Kalibrátor (1-6)	Kontroly	Vzorky
Testovací pufr	-	600 μL	400 μL	-	-	-
Kalibrátory	-	-	-	400 μL	-	-
Kontroly	-	-	-		400 μL	-
Vzorky	-	-	-		-	400 μL
Antisérum	-	-	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL

Protřepejte a inkubujte 6 hodin při 2-8 °C

^{125}I Indikátor	200 μL	
----------------------------	-------------------	--

Protřepejte a inkubujte 18-22 hodin při 2-8 °C

Dvojitá proti. pevné fáze	-	100 μL
---------------------------	---	-------------------

Protřepejte a inkubujte 30-60 minut při 2-8 °C

Protřepejte a odstředuje 15 min (1700 g) při 4 °C

Sced'te nebo odsajte supernatant a spočítejte radioaktivitu zbytku

Další překlady tohoto návodu k použití lze stáhnout z naší webové stránky:
<https://www.diasource-diagnostics.com/>