



IVD

CE

# Angiotensin I RIA

*KIPB3518*



# History

---

## Summary of change :

Previous Version :	Current Version :
200224/1	230421
Addition of the following sentence at the end of the English IFU: "Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <a href="https://www.diasource-diagnostics.com/">https://www.diasource-diagnostics.com/</a> "	In chapter PROCEDURE in section Preparation of enzymatic inhibitor solution addition of sentence about occasional presence of turbidity in Inhibitor after reconstitution.
IVD symbol added	Better specification of Iodine 125 characteristics table at the end of the chapter Appendix.
Chapter 8. <i>Quality Control</i> : email address <a href="mailto:tech.support@diasource.be">tech.support@diasource.be</a>	Chapter 8. <i>Quality Control</i> : update of the email address <a href="mailto:products.support@diasource.be">products.support@diasource.be</a>
Version: 200224/1	New DiaSource logo
No PI number	
Manufacturer symbol added	



# Angiotensin I RIA

en

## Radioimmunoassay of Angiotensin I for the in vitro determination of Plasma Renin Activity (PRA) in human plasma

### KIPB3518

### IN VITRO DIAGNOSTIC

DiaSource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

#### 1. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The Angiotensin I RIA KIT serves for the quantitative determination of plasma renin activity (PRA) by the radioimmunoassay of the product of the reaction, angiotensin I.

The generation of angiotensin I is the result of the enzymatic cleavage of the renin substrate, angiotensinogen, in plasma samples in the presence of ACE inhibitor (ACE - Angiotensin-Converting Enzyme), an enzymatic inhibitor that blocks the conversion of angiotensin I to angiotensin II.

The radioimmunoassay of angiotensin I is a competition assay. Samples and calibrators are incubated with <sup>125</sup>I-labeled angiotensin I, as a tracer, in polyclonal antibody-coated tubes. After incubation, the contents of the tubes are rinsed so as to remove unbound <sup>125</sup>I-labeled tracer. The bound radioactivity is then determined in a gamma counter. The angiotensin I concentrations in the samples are obtained by interpolation from the standard curve. The concentration of angiotensin I in the samples is indirectly proportional to the radioactivity.

#### 2. REAGENTS PROVIDED

All reagents of the kit are stable until the expiry date indicated on the kit label, if stored at 2-8°C. Storage conditions for reagents after reconstitution or dilution are indicated in paragraph Assay Procedure. Expiry dates printed on component vial labels apply to the long-term storage by manufacturer only, prior to assembling of the kit. Do not take into account.



**Anti-angiotensin polyclonal antibody-coated tubes:**  
2 x 50 tubes (ready-to-use)

**<sup>125</sup>I-labeled angiotensin I: one 11 ml vial (ready-to use)**

The vial contains 260 kBq, at the date of manufacture, of <sup>125</sup>I-labeled angiotensin I in buffer with bovine serum albumin and a dye.

**Calibrators: 6 x 1 ml vials (ready-to-use)**

The calibrator vials contain from 0 to approximately 30 ng/mL of angiotensin I in buffer with bovine serum albumin and sodium azide (<0.1%; see § Precautions). The exact concentration is indicated on each vial label. The calibrators are traceable to the international standard 86/536.

**Control sample: one 1 ml vial (ready-to-use)**

The vial contains angiotensin I in buffer with bovine serum albumin and sodium azide (<0.1%; see § Precautions). The concentration range is indicated on a supplement. The control sample is traceable to the international standard 86/536.

**Enzymatic inhibitor; one vial (lyophilized)**

Inhibitor contains sodium azide (<0.1%, see § Precautions)

**Wash Solution (20x): one 50 ml vial**

Concentrated solution has to be diluted before use

Ag	<sup>125</sup> I
----	------------------

CAL	N
-----	---

CONTROL
---------

NEUTR	SOLN
-------	------

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

#### 3. MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

In addition to standard laboratory equipment, the following items are required:

- Precision micropipette (75 µL).
- Semi-automatic pipette (100 µL, 200 µL, 2 mL).
- Water bath.
- Ice bath.
- Vortex type mixer.
- Horizontal or orbital shaker.
- Aspiration system.
- Gamma counter set for <sup>125</sup>I.

#### 4. PRECAUTIONS

##### 4.1 General remarks:

- Enzymatic inhibitor solution, calibrators, control sample and analyzed samples must be cooled to 2-8°C before pipeting.
- The vials with calibrators and controls should be opened as shortly as possible to avoid excessive evaporation.
- Do not mix the reagents from kits of different lots.
- A standard curve must be established with each assay.
- It is recommended to perform the immunoassay in duplicate.
- Each tube must be used only once.

##### 4.2 Basic rules of radiation safety

The purchase, possession, utilization, and transfer of radioactive material is subject to the regulations of the country of use.

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

- No eating, drinking, smoking or application of cosmetics should be carried out in the presence of radioactive materials.
- No pipetting of radioactive solutions by mouth.
- Avoid all contact with radioactive materials by using gloves and laboratory overalls.
- All manipulation of radioactive substances should be done in an appropriate place, distant from corridors and other busy places.
- Radioactive materials should be stored in the container provided in a designated area.
- A record of receipt and storage of all radioactive products should be kept up to date.
- Laboratory equipment and glassware which are subject to contamination should be segregated to prevent cross-contamination of different radioisotopes.
- Each case of radioactive contamination or loss of radioactive material should be resolved according to established procedures.
- Radioactive waste should be handled according to the rules established in the country of use.

##### 4.3 Sodium azide

Some reagents contain sodium azide as a preservative. Sodium azide can react with lead, copper or brass to form explosive metal azides. Sodium azide disposal must be in accordance with appropriate local regulations.

##### 4.4 ProClin 300

R43 may cause sensitisation by skin contact

##### 4.5 Materials of human origin

The materials of human origin, contained in this kit, were found negative for the presence of antibodies to HIV 1 and HIV 2, antibodies to HCV, as well as of Hepatitis B surface antigen (HBsAg). However, they should be handled as if capable of transmitting disease. No known test method can offer total assurance that no virus is present. Handle this kit with all necessary precautions.

All patient specimens should be handled as potentially infectious and waste should be discarded according to the country rules.

#### 5. SPECIMEN COLLECTION, PROCESSING, STORAGE AND DILUTION

- Plasma samples have to be collected into cold EDTA tubes
- Separate plasma from cells by centrifugation at 2-8°C.
- Keep plasma samples frozen (<-20°C, 1 year maximum) if determination is not to be performed immediately, after aliquoting in order to avoid repeated freezing and thawing.

Note: The temperature of plasma samples must be kept at 2-8°C in the course of sampling. Avoid further manipulation to prevent both formation and decomposition of angiotensin I.

- If samples have concentrations greater than the highest calibrator, they must be diluted into the zero calibrator.

## 6. ASSAY PROCEDURE

### 6.1 Preparation and storage of reagents

#### 6.1.1 Preparation of enzymatic inhibitor solution

The content of the vials is reconstituted with the volume of cold distilled water (4°C) indicated on the label and mixed. The reconstituted enzymatic inhibitor may be stored at 2-8°C until the expiry date of the kit. Occasional presence of turbidity in Inhibitor after reconstitution does not affect assay performance.

#### 6.1.2. Preparation of wash solution

Pour the content of the vial into 950 mL of distilled water and homogenize. The diluted solution may be stored at 2-8°C until the expiry date of the kit.

### 6.2 Enzymatic step – generation of Angiotensin I

#### 6.2.1 Remarks and recommendations

- The enzymatic inhibitor has to be cooled to 4°C before addition to the sample.
- Both incubation temperatures (4°C and 37°C) must be adhered to strictly, even slight variations may cause severe errors in determination.
- The enzymatic incubation time at 37°C should be determined as precisely as possible and kept within narrow limits for the whole set of tubes.
- The promptness of the temperature increase from 4°C to 37°C and the following reverse drop are critical. A circulating water bath is convenient for warming and, the use of an iced-cooled water bath is advisable for cooling.
- The promptness of the temperature increase and drop may be improved by using tubes made of material with good thermal conductivity (glass).
- If low plasma renin activity of the sample is expected, the incubation time of the enzymatic step may be prolonged for up to 3 hours.

#### 6.2.2 Enzymatic step – procedure

**Attention: Do not treat the calibrators and the control sample.**

- Add 200 µL of pre-cooled enzymatic inhibitor to 200 µL of each plasma sample and mix.
- Split each sample into two 200 µL aliquots.
- Place the first aliquot into an ice-cold water bath in a refrigerator (intended for the determination of background angiotensin I at 4°C).
- Place the second one into the water bath set for 37°C (intended for the determination of generated angiotensin I at 37°C).
- Incubate all aliquots for 1 hour.

- After incubation, cool samples from 37°C to 4°C rapidly using ice water bath

### 6.3 Immunoassay procedure

Step 1 Additions *	Step 2 Incubation	Step 3 Counting
To antibody coated tubes, add successively: - 75 µL of calibrator, control or sample after enzymatic incubation at 37°C and at 4°C respectively and - 100 µL of tracer.** Vortex gently 1-2 seconds.	Incubate 2 hours at 18-25°C with shaking (> 280 rpm).	Aspirate carefully the contents of tubes (except the 2 tubes "total cpm").  Wash with 2 mL of wash solution.  Aspirate twice.  Determine activity (cpm) for 1 min.

\* Calibrators, control sample and analyzed samples have to be cooled to 4°C before pipeting. Mix samples gently before they are added.

\*\* Add 100 µL of tracer to 2 additional tubes to obtain total cpm.

## 7. RESULTS

Results are obtained from the calibration curve by interpolation. The curve serves for the determination of angiotensin I concentrations in samples measured at the same time as the calibrators.

### 7.1 Calibration curve

The results in the quality control department were calculated using cubic regression curve fit with logit of B/T or B/B0 on the vertical axis and log of analyte concentration of the calibrators on the horizontal axis.

Other calculation methods may give slightly different results.

Total activity : 68 511 cpm				
Calibrators	Angiotensin I (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B0 (%)
0	0.00	17 444	25.5	100
1	0.30	13 732	20.0	78.7
2	1.00	9 390	13.7	53.8
3	3.00	5 431	7.93	31.1
4	10.0	2 746	4.01	15.7
5	30.0	1 243	1.81	7.13

(Example of calibration curve, do not use for calculation)

## 7.2 Samples

For the control and samples incubated at 4°C, or at 37°C, locate the B/T (%) or the B/B0 (%) value on the vertical axis and read off the corresponding angiotensin I concentration in ng/mL on the horizontal axis.

## 7.3 Calculation of plasma renin activity

The determination of plasma renin activity is performed indirectly by the measurement of the in vitro generation of angiotensin I (A-I) per hour. Background A-I, determined on plasma samples incubated at 4°C, is subtracted from the A-I generated at 37°C for the calculation of PRA using the following equation:

$$\text{PRA ng of A-I /mL/hr} = \frac{[A-I (37^\circ\text{C}) - A-I (4^\circ\text{C})] \times 2}{\text{Enzymatic incubation time (hrs)}}$$

Where

A-I (37°C): angiotensin concentration in ng/mL of sample incubated at 37°C

A-I (4°C): angiotensin concentration in ng/mL of sample incubated at 4°C

## 8. QUALITY CONTROL

Good laboratory practices imply that control samples must be used regularly to ensure the quality of the results obtained. These samples must be processed exactly in the same way as the assay samples, and it is recommended to analyse their results using appropriate statistical methods.

Failure to obtain the appropriate values for controls may indicate imprecise manipulations, improper sample handling or deterioration of reagents.

In case of packaging deterioration or if data obtained show some performance alteration, please contact your local distributor or use the following e-mail address:

[products.support@diasource.be](mailto:products.support@diasource.be)

According to EU regulation 2017/746, any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of EU Member State in which the user and/or patient is located.

## 9. EXPECTED VALUES

It is suggested that each laboratory establishes its own normal values. The PRA values obtained from healthy subjects presented below are indicative only.

N	Normal adult	2.5th - 97.5th percentile (ng/mL/hr)	Median (ng/mL/hr)	Min-Max (ng/mL/hr)
38	Early Morning, Supine	0.32-1.84	0.79	0.30-1.90
41	Upright, 2 Hours	0.60-4.18	2.20	0.48-4.88

Detail information about expected values for children (sorted according to age) can be found in the data sheet "appendix".

## 10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

(For more details, see the data sheet "APPENDIX")

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary

### 10.1 Sensitivity

10.1.1 Analytical sensitivity: 0.07 ng/mL

10.1.2 Functional sensitivity: 0.20ng/mL

### 10.2 Specificity

The antibody used in the immunoassay is highly specific for angiotensin I. Extremely low cross reactivity was obtained against several molecules. Moreover, the influence of possible interferences on PRA result is eliminated by subtraction of background.

### 10.3 Precision

#### 10.3.1 Intra-assay

Samples were assayed in at least 25 replicates in the same series. The coefficients of variation were found below or equal to 11.3%.

### 10.3.2 Inter-assay

Samples were assayed in duplicate in 10 different series. Coefficients of variation were found below or equal to 20.9%.

## 10.4 Accuracy

### 10.4.1 Dependence on time of enzymatic incubation

The samples were incubated with enzymatic inhibitor for 60, 120, and 180 minutes. No significant effect on PRA results was found.

### 10.4.2 Dilution test

High-concentration plasma samples were serially diluted in the zero calibrator. The recovery percentages obtained were between 78.2% and 98.8%.

### 10.4.3 Recovery test

Low-concentration plasma samples were spiked with known quantities of angiotensin I. The recovery percentages were obtained between 104% and 123%.

## 10.5 Measurement range (from analytical sensitivity to highest calibrator):

0.07 to approximately 30 ng/mL.

## 11. LIMITATIONS OF THE METHOD

Failure to follow these instructions for use (IFU) may significantly affect results. Results should be interpreted in the light of the total clinical presentation of the patient, including clinical history, data from additional tests and other appropriate information. Do not use hemolyzed, lipemic or icteric samples. For more details, see Appendix, § Interference.

In immunoassays, the possibility exists for interference by heterophile antibodies in the patient sample. Patients who have been regularly exposed to animals or have received immunotherapy or diagnostic procedures utilizing immunoglobulins or immunoglobulin fragments may produce antibodies, e.g. HAMA, that interfere with immunoassays. Immunoassays may be also affected by presence of anti-avidin or anti-streptavidin antibodies, as well as by the presence of autoantibodies directed against the determined analyte. Such interfering antibodies may cause erroneous results. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies [3, 4, 5].

## 12. BIBLIOGRAPHY

1. Funder J W, Carey R M, Mantero F, Murad M H, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young W F Jr. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* May 2016; 101(5): 1889-1916.
2. Bornstein S R, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer G D, Husebye E S, Merke D P, Murad M H, Stratakis C A, Torpy D J. Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* Feb 2016; 101(2): 364-389.
3. J Bjerner et al. - Immunometric Assay Interference - Incidence and Prevention; *Clin Chem* 48;4; 613-621, 2002
4. L J Kricka - Interferences in Immunoassay - Still a Threat; *Clin Chem* 46, No. 8, 2000
5. A. Dasgupta: Biotin and Other Interferences in Immunoassays – A Concise Guide. Elsevier, St. Louis, 2019
6. Approved Guideline - Interference Testing in Clinical Chemistry, EP07 3rd Edition. April 2018. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Revision date : 2023-04-21

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

## APPENDIX

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

#### Interference

Plasma samples containing angiotensin I concentrations (low and high) were spiked with multiple concentrations of the substances listed below and assayed using Angiotensin I RIA KIT. Values were calculated as described in CLSI EP07, 3rd ed. [6]. Interference was determined by testing controls (no interfering substance added) and matched test samples (with interfering substance added). No interference (defined as a shift in dose > 15 %) was found for addition of interferent up to concentration stated in the table below.

Interferent	Test concentration
Biotin	1,631 NG/ML
Conjugated bilirubin	474.4 µG/ML
Hemoglobin	10,044 µG/ML
Triglycerides	15.20 MG/ML
Unconjugated bilirubin	384.3 µG/ML

In spite of hemoglobin, bilirubin (conjugated, unconjugated) and triglyceride interference data in the table, we advise to avoid using hemolyzed, lipemic or icteric samples.

#### Specificity

Analogue	Cross-reactivity (%)
Angiotensin I	100
Angiotensin II	ND
Angiotensin III	ND
Tetradecapeptide	ND
Angiotensinogen	ND

ND = Non-detectable

#### Precision

##### Intra-assay

Sample	P1	P2
Number of determinations	25	25
Pra, ng/ml/hour	1.49	2.94
Cv (%)	11.25	11.25

##### Inter-assay

After generation of Angiotensin I, samples were determined in duplicates in 10 different series according to the procedure of the kit. Plasma renin activity was obtained and used for the calculation of inter-assay precision.

Sample	P1	P2	P3	P4	P5
Number of determinations	10	10	10	10	10
Pra, ng/ml/hour	0.69	3.37	7.08	15.09	24.15
Cv (%)	20.9	9.57	8.72	9.74	11.8

#### Accuracy

##### Dependence on time of enzymatic incubation

No dependence of PRA on time was observed.

Time, minutes		60	120	180
Pra Ng/ml/hour	Sample 1	0.30	0.32	0.33
	Sample 2	0.56	0.48	0.53
	Sample 3	1.04	1.15	1.19
	Sample 4	1.64	1.56	1.65
	Sample 5	5.12	5.19	4.93

#### Dilution test

Samples were diluted in zero calibrator and assayed according to the assay procedure of the kit.

Sample	Dilution Factor	Theoretical conc.	Observed conc.	Recovery (%)
		(NG/ML)		
P1	-	-	2.45	-
	1:2	1.23	1.21	98.78
	1:4	0.61	0.56	91.43
	1:8	0.31	0.27	88.16
P2	-	-	3.05	-
	1:2	1.53	1.46	95.74
	1:4	0.76	0.64	83.93
	1:8	0.38	0.34	89.18
P3	-	-	9.21	-
	1:2	4.61	4.30	93.38
	1:4	2.30	1.82	79.04
	1:8	1.15	0.90	78.18
	1:16	0.58	0.45	78.18

### Recovery test

Plasma samples were spiked with known quantities of angiotensin I and assayed according to the procedure of the kit.

Initial conc. (ng/ml)	Added angiotensin (ng/ml)	Observed conc. (ng/ml)	Observed addition (ng/ml)	Recovery (%)
0.88	1.01	1.89	2.09	110.7
	1.30	2.18	2.68	122.9
	1.93	2.81	3.20	113.9
1.39	1.01	2.40	2.64	110.2
	1.30	2.69	2.98	110.8
	1.93	3.32	3.59	108.2
1.54	1.01	2.54	2.84	111.7
	1.30	2.84	3.31	116.7
	1.93	3.46	4.03	116.4
2.60	1.01	3.61	3.83	106.2
	1.30	3.90	4.59	117.7
	1.93	4.53	5.20	114.9
2.62	1.01	3.62	3.75	103.5
	1.30	3.92	4.19	107.0
	1.93	4.55	4.82	106.0

### Expected data for children

Results are sorted according to age.

Children		Angiotensin (ng/ml/hr)				
Upright	N	Min	Max	Median	2.5 <sup>th</sup> percentile	97.5 <sup>th</sup> percentile
2-9 years	27	0.60	7.38	3.20	0.76	6.64
10-15 years	16	0.58	3.98	1.52	0.64	3.93

### <sup>125</sup>I Characteristics

T<sub>1/2</sub> (<sup>125</sup>I) = 1443 h = 60.14 d

<sup>125</sup> I	E (MeV)	%
γ	0.035	6.5
K <sub>α</sub> X-RAY	0.027	112.5
K <sub>β</sub> X-RAY	0.031	25.4





# Angiotensin I RIA

es

Radioinmunoanálisis de la angiotensina I para la determinación cuantitativa in vitro de la actividad plasmática de la renina (pra) en plasma humano

KIPB3518

DIAGNÓSTICO IN VITRO

DiaSource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

## 1. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La Angiotensina I RIA sirve para la determinación cuantitativa de la actividad plasmática de la renina (PARA) por medio de un radioinmunoanálisis del producto de reacción, la angiotensina I.

La generación de la angiotensina I es el resultado del corte enzimático del sustrato de renina, en plasma humano en presencia del inhibidor ACE (ECE enzima convertidora de la angiotensina I); un inhibidor enzimático que bloquea la conversión de angiotensina I en angiotensina II.

El radioinmunoensayo de angiotensina I es un ensayo de competencia. Las muestras y los calibradores se incuban con angiotensina I marcada con <sup>125</sup>I, como marcador, en tubos recubiertos con anticuerpo policlonal. Tras la incubación, el contenido de los tubos se enjuaga para eliminar el marcador no unido marcado con <sup>125</sup>I. La radioactividad unida se determina a continuación en un contador gamma. Las concentraciones de angiotensina I en las muestras se obtienen mediante interpolación a partir de la curva estándar. La concentración de angiotensina I en las muestras es indirectamente proporcional a la radioactividad.

## 2. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Todos los reactivos provistos son estables entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad del equipo, la cual se indica en la etiqueta externa. Las fechas de caducidad impresas sobre las etiquetas de los frascos son válidas sólo para el fabricante, durante su almacenamiento a largo plazo hasta antes del ensamblaje del equipo. No tener en cuenta.

Las condiciones de almacenamiento de los reactivos después de la reconstitución o dilución se indican en el párrafo Procedimiento.



**Tubos recubiertos con anticuerpo policlonal anti-angiotensina I: 2 x 50 tubos** (listos para usar)

Ag	125I
----	------

**Angiotensina I marcada con I<sup>125</sup>: un frasco de 11 mL** (listo para usar)

El frasco contiene 260 kBq de angiotensina I marcada con <sup>125</sup>I, en la fecha de fabricación, en amortiguador con suero bovino un colorante.

CAL	N
-----	---

**Calibradores: seis frascos 1 mL** (listos para su uso)  
Los viales de calibrador contienen de 0 a aproximadamente 30 ng/mL de angiotensina I en tampón con albúmina sérica bovina y azida sódica (< 0,1 %). La concentración exacta se indica en la etiqueta de cada vial. Los calibradores son trazables con respecto al estándar internacional 86/536.

CONTROL
---------

**Muestra control testigo: un frasco de 1 mL** (listo para su uso)

El vial contiene angiotensina I en tampón con albúmina sérica bovina y azida sódica (< 0,1 %). Los valores esperados se sitúan en el intervalo de concentración indicado en un suplemento. La muestra de control es trazable con respecto al estándar internacional 86/536.

NEUTR	SOLN
-------	------

**Inhibidor enzimático: un frasco (liofilizado)**  
El inhibidor contiene azida sódica (< 0,1 %).

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

**Solución de lavado (20x): un frasco de 50 mL**  
Diluir la solución concentrada antes del uso.

## 3. MATERIAL REQUERIDO PERO NO PROPORCIONADO

Además del equipo normal de laboratorio se requiere lo siguiente:

- Micropipeta de precisión (75 µL).
- Pipeta semiautomática (100 µL, 200 µL y 2 mL).
- Baño María.

- Baño de hielo.
- Agitador tipo vórtex.
- Agitador con movimiento de vaivén horizontal o orbital.
- Sistema de aspiración.
- Contador gamma calibrado para <sup>125</sup>I.

## 4. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

### 4.1 Precauciones generales

- La solución del inhibidor enzimático, los calibradores y los controles deben enfriarse a 2-8 °C antes de utilizarse.
- Los viales de los calibradores y controles deben ser abiertos durante el menor tiempo posible, para así evitar evaporaciones excesivas.
- No mezclar los reactivos de lotes diferentes.
- Incluir una curva estándar en cada ensayo.
- Es recomendado realizar el ensayo por duplicado.
- Cada tubo debe estar utilizado solamente una vez.

### 4.2 Reglas básicas de seguridad radiológica

La compra, posesión, uso y transferencia de material radiactivo están sujetos de las disposiciones legales del país en el que se utiliza. El cumplimiento de las normas básicas de seguridad radiológica proporciona una protección adecuada.

- No se debe comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en presencia de materiales radiactivos.
- No pipetear las soluciones radiactivas con la boca.
- Evitar cualquier contacto con materiales radiactivos mediante el uso de guantes y bata de laboratorio.
- Toda manipulación de material radiactivo debe realizarse en el lugar adecuado, alejado de corredores y espacios ocupados.
- Los materiales radiactivos deben almacenarse en el contenedor aprobado en una zona especializada.
- Se debe llevar y conservar actualizado un registro de las entradas y almacenamiento de todos los productos radiactivos.
- El equipo y material de vidrio de laboratorio que son objeto de contaminación se deben separar para evitar la contaminación con otros radioisótopos.
- Cada caso de contaminación radiactiva, o de pérdida de materiales radiactivos se debe resolver de acuerdo con los procedimientos establecidos.
- El desecho radiactivo debe manipularse de acuerdo a las reglas establecidas por el país donde se utiliza.

### 4.3 Azida sódica

Algunos reactivos contienen azida sódica como conservante. La azida sódica puede reaccionar con el plomo, cobre o latón para formar azidas metálicas explosivas. La eliminación de la azida sódica debe efectuarse de acuerdo con las normativas locales adecuadas.

### 4.4 ProClin 300

R43: Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.

### 4.5 Material de origen humano

Los reactivos de este equipo son de origen humano y fueron negativos a las pruebas de HIV 1, de HIV 2; de HCV, así como de hepatitis B (Hbs Ag). Sin embargo, deben manejarse como si fueran capaces de transmitir enfermedad. Ninguna prueba conocida puede ofrecer la seguridad completa de la ausencia de agentes virulentos. Maneje estos reactivos con todas las precauciones necesarias.

Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran potencialmente infecciosas y los residuos deben desecharse siguiendo la normativa del país.

## 5. RECOLECCIÓN, PROCESAMIENTO, CONSERVACIÓN Y DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS

- Colectar la sangre en tubos fríos con EDTA.

- Separar el plasma de las células mediante centrifugación a 2-8 °C.
  - Guardar las muestras a <-20 °C (1 año máximo), si la determinación no se realizara inmediatamente, preparar alícuotas para evitar repetidas descongelaciones y congelaciones.
- Nota: La temperatura del plasma debe permanecer a 2-8 °C en el curso de su utilización. Evitar posteriores manipulaciones para evitar la formación y descomposición de la angiotensina I.
- Si las muestras tienen concentraciones más altas que el mayor de los calibradores, éstas deben ser diluídas con el calibrador cero.

## 6. PROCEDIMIENTO DEL ANÁLISIS

### 6.1 Preparación de los reactivos

#### 6.1.1 Preparación, solución del inhibidor enzimático

El contenido del vial se reconstituye mezclándolo con el volumen de agua destilada fría (4 °C) indicado en la etiqueta. El inhibidor enzimático reconstituido se puede almacenar a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad del kit. La presencia ocasional de turbidez en el inhibidor después de la reconstitución no afecta al rendimiento del ensayo.

#### 6.1.2 Preparación de la solución de lavado

Verter el contenido de un frasco en 950 mL de agua destilada y homogeneizar. La solución diluida se puede almacenar entre 2 y 8 °C hasta la fecha de caducidad del equipo.

### 6.2 Paso enzimático.– generación de la angiotensina I

#### 6.2.1 Notas y recomendaciones

- El inhibidor enzimático debe enfriarse a 4 °C antes de añadir la muestra.
- Deben respetarse estrictamente las temperaturas de incubación (4 °C y 37 °C). Aun las variaciones muy ligeras causan enormes errores en la determinación.
- El tiempo de pre-incubación enzimática a 37 °C debe determinarse precisamente como sea posible y debe mantenerse dentro de un límite muy estrecho para la incubación de todos los tubos.
- La verificación del incremento en la temperatura de 4 °C a 37 °C y la disminución de las mismas son muy importantes. Para entibiar el agua es recomendable utilizar un baño de agua circulante. Para enfriar el agua se recomienda el uso de un baño de agua con regulador de temperatura o enfriador.
- Se recomienda utilizar tubos hechos de un material conductor (vidrio) para optimizar el aumento y la disminución de la temperatura.
- Si se espera una actividad baja de la renina en las muestras, se deben aumentar hasta tres horas el tiempo de incubación en el paso enzimático.

#### 6.2.2 Paso enzimático – procedimiento

##### Cuidado : No realizarlo con los calibradores o muestras controles

- Adicionar 200 µL del inhibidor enzimático, previamente enfriado, a 200 µL de cada muestra de plasma y mezclar.
- Dividir cada muestra en dos alícuotas de 200 µL.
- Pasar una alícuota del baño de agua fría en hielo a un refrigerador (Para la determinación de la angiotensina I basal a 4 °C).
- Poner la segunda alícuota en un baño de agua 37 °C (Para la determinación de la angiotensina I generada a 37 °C).
- Incubar todas las alícuota durante 1 hora.
- Después de la incubación, enfriar las muestras de 37 °C a 4 °C inmediatamente con la ayuda del baño de agua helada (con hielo).

### 6.3 Procedimiento del ensayo

Paso 1 Adiciones*	Paso 2 Incubación	Paso 3 Cuento
A los tubos recubiertos de anticuerpo agregar sucesivamente: - 75 µL de calibradores, controles o muestras Después de la incubación enzimática a 37°C y a 4°C respectivamente y - 100 µL del trazador.** Mezcle suavemente con el Vortex durante 1-2 segundos.	Incubar 2 horas entre 18-25 °C agitando (≥ 280 rpm).	Aspirar cuidadosamente el contenido de los tubos (excepto el de los dos tubos "cpm total"). Lavar con 2 mL de la solución de lavado. Aspirar dos veces. Contar las cpm enlazadas (B) y las cpm totales (T) durante 1 min.

\* Antes de utilizar enfriar a 4°C los calibradores, las muestras controles y las muestras a analizar.

\*\* Agregar 100 µL de trazador a 2 tubos adicionales para obtener las cpm totales.

## 7. RESULTADOS

Los resultados se obtienen por interpolación a partir de la curva de calibración. La curva sirve para determinar las concentraciones de analito en muestras analizadas al mismo tiempo que los calibradores.

### 7.1 Curva de calibración

Los resultados del departamento de control de calidad se calcularon usando el ajuste de curva de regresión cúbica con logit de B/T o B/B0 en el eje vertical y el logaritmo de la concentración de analito de los calibradores en el eje horizontal. El empleo de otros métodos de cálculo de datos podría ocasionar resultados ligeramente diferentes.

Actividad total: 68 511 cpm				
Calibradores	Angiotensina I (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B0 (%)
0	0.00	17 444	25.5	100
1	0.30	13 732	20.0	78.7
2	1.00	9 390	13.7	53.8
3	3.00	5 431	7.93	31.1
4	10.0	2 746	4.01	15.7
5	30.0	1 243	1.81	7.13

(Ejemplo de curva de calibración, no utilizar como modelo para realizar los cálculos)

### 7.2 Muestras

7.3 Para cada muestra o control incubados a 4 °C, o a 37 °C, localiza los valores B/T o B/B0 sobre el eje vertical y leer la correspondiente concentración de la angiotensina I en ng/mL sobre el eje horizontal.

### 7.4 Cálculos de la actividad de la renina plasmática.

La determinación de la actividad de la renina de plasma se lleva a cabo indirectamente midiendo la generación de la angiotensina I (A-I) por hora. Para calcular la PRA, la A-I basal, determinada en las muestras de plasma incubadas a 4 °C, se sustrae de la A-I generada a 37 °C

utilizando la fórmula que se muestra a continuación:

$$\text{PRA ng de A-I /mL/hr} = \frac{[\text{A-I (37°C)} - \text{A-I (4°C)}] \times 2}{\text{Tiempo de incubación enzimática (hrs)}}$$

Donde:

A-I (37°C): concentración de la angiotensina I en ng/mL de la muestra incubada a 37°C

A-I (4°C): concentración de la angiotensina I en ng/mL de la muestra incubada a 4°C

## 8. CONTROL DE CALIDAD

Para la obtención de resultados óptimos se recomienda el uso de los controles en cada ensayo para asegurar la calidad de los resultados obtenidos. Dichos controles deben ser procesados de la misma manera que las muestras a analizar. Se recomienda que los resultados sean analizados utilizando los métodos estadísticos apropiados.

No obtener valores apropiados para los controles puede indicar que la manipulación ha sido imprecisa, que la muestra no se ha manejado de forma adecuada o que los reactivos se han deteriorado.

En caso de detectar un deterioro en el empaquetado del producto o que los resultados expresen una alteración en las características del mismo, contactar con el Distribuidor local o notificar a la dirección de e-mail: [products.support@diasource.be](mailto:products.support@diasource.be)

De conformidad con el Reglamento UE 2017/746, se han producido algunas incidencias graves relacionadas con el dispositivo que deben notificarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro de la UE en el que residen el usuario o el paciente.

## 9. VALORES ESPERADOS

Se aconseja a cada laboratorio establecer sus propios valores de referencia. Los valores siguientes, determinados sobre sujetos presuntamente sanos, son dados a título indicativo:

N	Adulto normal	2.5 - 97.5 percentile (ng/mL/h)	Mediana (ng/mL/h)	Min-Max (ng/mL/h)
38	Mañana, supino	0.32-1.84	0.79	0.30-1.90
41	Posición erguida, 2 horas	0.60-4.18	2.20	0.48-4.88

Información detallada acerca de los valores esperados para niños clasificada de acuerdo a la edad) puede ser encontrada en la hoja de datos "appendices".

## 10. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

(Ver la hoja "APPENDIX" para más detalles)

Se facilitan datos representativos solo a modo de ejemplo. El rendimiento obtenido en los distintos laboratorios puede variar.

### 10.1 Sensibilidad

10.1.1 Sensibilidad Analítica: 0.07 ng/mL

10.1.2 Sensibilidad Funcional: 0.20 ng/mL

### 10.2 Especificidad

El anticuerpo utilizado en el inmunoensayo es muy específico para la angiotensina I. Se obtuvo una reactividad cruzada extremadamente baja frente a varias moléculas.

Sin embargo, la influencia de posibles interferencias que pueden resultar en la PRA, se elimina por la sustracción de su nivel basal.

### 10.3 Reproducibilidad

#### 10.3.1 Intra-análisis

Las muestras se evaluaron 25 duplicados en las mismas series. Los coeficientes de variación fueron iguales o por debajo de 11,3 %.

#### 10.3.2 Inter-análisis

Las muestras se evaluaron en duplicado en 10 series diferentes. Los coeficientes de variación fueron iguales o por debajo de 20,9 %.

### 10.4 Precisión

#### 10.4.1 Efecto del tiempo de incubación en la actividad enzimática.

Las muestras fueron incubadas en presencia del inhibidor enzimático por 60, 120, y 180 minutos. No se observó algún efecto significativo en los resultados de PRA.

#### 10.4.2 Prueba de dilución

Las muestras de plasma de alta concentración se diluyeron en serie en el calibrador cero. Los porcentajes de recuperación obtenidos oscilaron entre el 78,2 % y el 98,8 %.

#### 10.4.3 Prueba de recuperación

Las muestras de plasma de baja concentración se enriquecieron con cantidades conocidas de angiotensina I. Los porcentajes de recuperación obtenidos oscilaron entre el 104 % y el 123 %.

10.5 Rango de medición (desde sensibilidad analítica hasta el calibrador más elevado): De 0,07 hasta aproximadamente 30 ng/mL.

## 11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Siga atentamente las instrucciones de uso ya que de lo contrario, los resultados pueden verse afectados significativamente.

Los resultados deberán ser interpretados como una ayuda dentro de la situación clínica del paciente, incluyendo la historia clínica, así como los datos provenientes de otras tests adicionales.

No utilizar muestras hemolizadas, lipémicas o con exceso de bilirrubina. Para saber más detalles, consulte la sección Interference (Interferencia) del Appendix (Anexo). En el caso de inmunoanálisis, existe la posibilidad de que se produzcan interferencias debidas a anticuerpos heterófilos presentes en la muestra del paciente. Los

pacientes expuestos de manera frecuente a animales o que hayan sido tratados mediante inmunoterapia o procedimientos de diagnóstico que emplean inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas pueden producir anticuerpos (p. ej., HAMA, que interfieren en los inmunoanálisis). El inmunoanálisis también puede verse afectado por la presencia de anticuerpos antiavidina o antiestreptavidina, así como por la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra el analito determinado. Estos anticuerpos interferentes pueden causar resultados erróneos. Deben evaluarse cuidadosamente los resultados de los pacientes que se sospeche que puedan tener esos anticuerpos [3, 4, 5].

## 12. REFERENCIAS

1. Funder j w, carey r m, mantero f, murad m h, reincke m, shibata h, stowasser m, young w f jr. The management of primary aldosteronism: case detection, diagnosis, and treatment: an endocrine society clinical practice guideline. J clin endocrinol metab. May 2016; 101(5): 1889-1916.
2. Bornstein s r, allolio b, arlt w, barthel a, don-wauchope a, hammer g d, husebye e s, merke d p, m h murad, stratakis c a, torpy d j. Diagnosis and treatment of primary adrenal insufficiency: an endocrine society clinical practice guideline. J clin endocrinol metab. Feb 2016; 101(2): 364-389.
3. J bjerner et al. - immunometric assay interference - incidence and prevention; clin chem 48;4; 613-621, 2002
4. L j kricka - interferences in immunoassay - still a threat; clin chem 46, no. 8, 2000
5. A. Dasgupta: biotin and other interferences in immunoassays – a concise guide. Elsevier, st. Louis, 2019
6. Approved guideline - interference testing in clinical chemistry, ep07 3rd edition. April 2018. Clinical and laboratory standards institute.

Revision date : 2023-04-21

## APPENDIX

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

#### Interference

Plasma samples containing angiotensin I concentrations (low and high) were spiked with multiple concentrations of the substances listed below and assayed using Angiotensin I RIA KIT. Values were calculated as described in CLSI EP07, 3rd ed. [6]. Interference was determined by testing controls (no interfering substance added) and matched test samples (with interfering substance added). No interference (defined as a shift in dose > 15 %) was found for addition of interferent up to concentration stated in the table below.

Interferent	Test concentration
Biotin	1,631 NG/ML
Conjugated bilirubin	474.4 µG/ML
Hemoglobin	10,044 µG/ML
Triglycerides	15.20 MG/ML
Unconjugated bilirubin	384.3 µG/ML

In spite of hemoglobin, bilirubin (conjugated, unconjugated) and triglyceride interference data in the table, we advise to avoid using hemolyzed, lipemic or icteric samples.

#### Specificity

Analogue	Cross-reactivity (%)
Angiotensin I	100
Angiotensin II	ND
Angiotensin III	ND
Tetradecapeptide	ND
Angiotensinogen	ND

ND = Non-detectable

#### Precision

##### Intra-assay

Sample	P1	P2
Number of determinations	25	25
Pra, ng/ml/hour	1.49	2.94
Cv (%)	11.25	11.25

##### Inter-assay

After generation of Angiotensin I, samples were determined in duplicates in 10 different series according to the procedure of the kit. Plasma renin activity was obtained and used for the calculation of inter-assay precision.

Sample	P1	P2	P3	P4	P5
Number of determinations	10	10	10	10	10
Pra, ng/ml/hour	0.69	3.37	7.08	15.09	24.15
Cv (%)	20.9	9.57	8.72	9.74	11.8

#### Accuracy

##### Dependence on time of enzymatic incubation

No dependence of PRA on time was observed.

Time, minutes		60	120	180
Pra Ng/ml/hour	Sample 1	0.30	0.32	0.33
	Sample 2	0.56	0.48	0.53
	Sample 3	1.04	1.15	1.19
	Sample 4	1.64	1.56	1.65
	Sample 5	5.12	5.19	4.93

#### Dilution test

Samples were diluted in zero calibrator and assayed according to the assay procedure of the kit.

Sample	Dilution Factor	Theoretical conc.	Observed conc.	Recovery (%)
		(NG/ML)		
P1	-	-	2.45	-
	1:2	1.23	1.21	98.78
	1:4	0.61	0.56	91.43
	1:8	0.31	0.27	88.16
P2	-	-	3.05	-
	1:2	1.53	1.46	95.74
	1:4	0.76	0.64	83.93
P3	-	-	9.21	-
	1:2	4.61	4.30	93.38
	1:4	2.30	1.82	79.04
	1:8	1.15	0.90	78.18
	1:16	0.58	0.45	78.18

**Recovery test**

Plasma samples were spiked with known quantities of angiotensin I and assayed according to the procedure of the kit.

Initial conc. (ng/ml)	Added angiotensin (ng/ml)	Observed conc. (ng/ml)	Observed addition (ng/ml)	Recovery (%)
0.88	1.01	1.89	2.09	110.7
	1.30	2.18	2.68	122.9
	1.93	2.81	3.20	113.9
1.39	1.01	2.40	2.64	110.2
	1.30	2.69	2.98	110.8
	1.93	3.32	3.59	108.2
1.54	1.01	2.54	2.84	111.7
	1.30	2.84	3.31	116.7
	1.93	3.46	4.03	116.4
2.60	1.01	3.61	3.83	106.2
	1.30	3.90	4.59	117.7
	1.93	4.53	5.20	114.9
2.62	1.01	3.62	3.75	103.5
	1.30	3.92	4.19	107.0
	1.93	4.55	4.82	106.0

**Expected data for children**

Results are sorted according to age.

Children		Angiotensin (ng/ml/hr)				
Upright	N	Min	Max	Median	2.5 <sup>th</sup> percentile	97.5 <sup>th</sup> percentile
2-9 years	27	0.60	7.38	3.20	0.76	6.64
10-15 years	16	0.58	3.98	1.52	0.64	3.93

**<sup>125</sup>I Characteristics**

T<sub>1/2</sub> (<sup>125</sup>I) = 1443 h = 60.14 d

<sup>125</sup> I	E (MeV)	%
γ	0.035	6.5
K <sub>α</sub> X-RAY	0.027	112.5
K <sub>β</sub> X-RAY	0.031	25.4



## Radioimmunoassay für die in-vitro bestimmung der plasma renin aktivität (PRA) in humanem plasma

### KIPB3518

### IN VITRO DIAGNOSTIC

DiaSource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

#### 1. TESTPRINZIP

Der Angiotensin RIA wird für die Bestimmung der Plasma Renin Aktivität anhand des Reaktionsprodukts, Angiotensin I, benutzt.

Angiotensin I ist das Produkt der enzymatischen Fragmentierung des Renin Substrats, Angiotensinogen, in Plasma Proben, in Anwesenheit eines ACE Inhibitors (ACE-Angiotensin-Konvertierungsenzym). Dieser Enzyminhibitor inhibiert die Umwandlung des Angiotensin I in Angiotensin II.

Der Radioimmunoassay für Angiotensin I ist ein kompetitiver Assay. Proben und Kalibratoren werden in mit polyklonalem Antikörper beschichteten Röhrchen mit <sup>125</sup>I markiertem Angiotensin I als Tracer inkubiert. Nach der Inkubation wird der Inhalt der Röhrchen gespült, um den nicht gebundenen, mit <sup>125</sup>I markierten Tracer zu entfernen. Die gebundene Radioaktivität wird anschließend mittels Gamma-Zähler gemessen. Die Angiotensin-I-Konzentration in den Proben wird durch Interpolation der Standardkurve ermittelt. Die Konzentration von Angiotensin I in den Proben ist indirekt proportional zur Radioaktivität.

#### 2. MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Die Reagenzien sind bis zum Verfallsdatum verwendbar, wenn sie bei 2-8 °C gelagert werden. Auf die Fläschchen gedruckte Verfallsdaten betreffen nur die Langzeitlagerung beim Hersteller, vor der Zusammensetzung des Kits. Bitte nicht beachten. Lagerungsbedingungen für Reagenzien nach der Rekonstitution oder Verdünnung werden im Abschnitt „Verfahren“ angegeben.



**Röhrchen mit anti- Angiotensin I poliklonalen Antikörpern beschichtet : 2x 50 Röhrchen (gebrauchsfertig)**

Ag	<sup>125</sup> I
----	------------------

**<sup>125</sup>I-markierte Anti- Angiotensin I -Antikörper Lösung: eine 11 mL Flasche (gebrauchsfertig)**

Die Flasche enthält 260 kBq (am Tag der Herstellung) des <sup>125</sup>I-markierten Anti- Angiotensin I in Puffer mit Bovinem Serum Albumin und einem Farbstoff.

CAL	N
-----	---

**Kalibratoren: sechs 1mL Fläschchen (gebrauchsfertig)**

Die Kalibratorfläschchen beinhalten zwischen 0 und circa 30 ng/mL Angiotensin I in Puffer mit Rinderserumalbumin und Natriumazid (< 0,1 %). Die exakte Konzentration ist auf jedem Fläschchenetikett angegeben. Die Kalibratoren sind auf den internationalen Standard 86/536 rückführbar.

CONTROL
---------

**Kontrollprobe: ein 1mL Fläschchen (gebrauchsfertig)**

Das Fläschchen beinhaltet Angiotensin I in Puffer mit Rinderserumalbumin und Natriumazid (< 0,1 %). Der Konzentrationsbereich wird auf einem Beiblatt angegeben. Die Kontrollprobe ist auf den internationalen Standard 86/536 rückführbar.

NEUTR	SOLN
-------	------

**Enzyminhibitor: ein Fläschchen (lyophilisiert)**

Der Inhibitor enthält Natriumazid (< 0,1 %).

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

**Waschlösung (20x): eine 50 mL Flasche**

Konzentrierte Lösung muss vor dem Gebrauch verdünnt werden.

#### 3. ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Zusätzlich zu der Standardlaborausstattung, werden die folgenden Materialien benötigt:

- Präzisionsmikropipette (75 µL).
- Halbautomatische Pipette (100 µL, 200 µL und 2 mL).
- Wasserbad.
- Eisbad.
- Vortex-Mixer.
- Horizontal- oder Orbitalschüttler.
- Absaugsystem.
- Gamma-Counter für <sup>125</sup>I.

#### 4. WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

##### 4.1 Allgemeinhinweise:

- Enzymatischer Inhibitor, Proben, Kontrollprobe und Kalibratoren sollten vor dem Pipettieren abgekühlt werden (4 °C).
- Die Kalibrator- und Kontrollfläschchen sollten so kurz wie möglich geöffnet werden, um eine übermäßige Verdunstung zu vermeiden.
- Reagenzien aus Kits von verschiedenen Produktionsserien sollten nicht miteinander vermischt werden.
- Eine Standardkurve ist für jeden Assay notwendig.
- Der Assay sollte in Doppelbestimmung durchgeführt werden.
- Jedes Röhrchen darf nur einmal verwendet werden. 4.2 Schutz vor radioaktiver Strahlung

##### 4.2 Grundregeln der Handhabung von Radioaktivität

Annahme, Besitz und Verwendung, Lagerung, Transport und Beseitigung unterliegen den Vorschriften der Atomenergie- bzw. der jeweiligen staatlichen Behörde. Die Einhaltung der Grundregeln beim Umgang mit Radioaktivität sollte eine ausreichende Sicherheit gewährleisten:

- In Räumen, in denen mit radioaktiven Materialien gearbeitet wird, sollte Essen, Trinken, Rauchen und das Auftragen von Kosmetika vermieden werden.
- Keine Mundpipette verwenden.
- Direkter Kontakt mit radioaktiven Materialien sollte durch Tragen entsprechender Schutzkleidung (Laborkittel, Handschuhe) vermieden werden.
- Das Arbeiten mit radioaktiven Stoffen muß in dafür speziell gekennzeichneten Bereichen, die vom normalen Laborbetrieb abgetrennt sind, erfolgen.
- Radioaktive Materialien sollten in einem speziell gekennzeichneten Bereich gelagert werden.
- Ein Register der Eingänge und Lagerung aller radioaktiven Produkte sollte ständig aktualisiert werden.
- Kontaminierte Labor- und Glasgeräte sollten isoliert werden, um eine Kreuzkontamination von verschiedenen Radioisotopen zu verhindern.
- Kontaminationen des Arbeitsplatzes müssen unverzüglich sorgfältig nach den üblichen Verfahren entfernt werden.
- Radioaktiver Abfall muss entsprechend den Richtlinien jedes Einsatzortes entsorgt werden.

##### 4.3 Natriumazid

Einige Reagenzien enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Natriumazid kann mit Blei, Kupfer oder Messing reagieren und dabei explosive Metallazide bilden. Natriumazid muss entsprechend den örtlichen behördlichen Vorschriften entsorgt werden.

##### 4.4 ProClin 300

R43: Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.

##### 4.5 Bestandteile menschlichen Ursprungs

Bestandteile menschlichen Ursprungs, die für diesen Kit verwendet wurden, sind auf HIV-1 und HIV-2 Antikörper, HCV Antikörper und Hepatitis B surface Antigen (HbsAg) getestet und als nicht reaktiv befunden wurden. Es ist so vorzugehen, als ob eine tatsächliche An- steckungsgefahr bestünde. Keine Testmethode

kann völlige Sicherheit bieten. Der Kit sollte mit allen notwendigen Sicherheitsvorkehrungen behandelt werden.

Alle Patientenproben sind als potenziell infektiös zu handhaben und sämtliche Abfälle müssen gemäß den Vorschriften des jeweiligen Landes entsorgt werden.

## 5. PROBENENTNAHME, -BEHANDLUNG, -LAGERUNG UND -VERDÜNNUNG

- Sammeln Sie die Plasmaproben in kalten EDTA Röhrchen.
- Trennen Sie die Zellen vom Plasma durch Zentrifugation bei 2-8 °C.
- Wenn die Bestimmung verschoben werden muss, sollten die Proben eingefroren werden (bei <-20 °C, maximum 1 Jahr) und aliquotiert um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden.

Anmerkung: Plasmatemperatur sollte während Sammeln bei 2-8 °C gehalten werden. Vermieden Sie weitere Manipulationen um beide Bildung und Fragmentierung des Angiotensins I zu vermeiden.

- Wenn die Proben Konzentrationen über dem höchsten Kalibratorwert haben, müssen sie mit Nullkalibrator verdünnt werden.

## 6. VERFAHREN

### 6.1 Präparation der Reagenzien

#### 6.1.1 Präparation des Enzyminhibitors

Der Inhalt des Fläschchens wird mit dem auf dem Etikett angegebenen Volumen kalten destillierten Wassers (4 °C) rekonstituiert und vermischt. Der rekonstituierte enzymatische Inhibitor kann bis zum Verfallsdatum des Kits bei 2-8 °C aufbewahrt werden.

Gelegentlich kann es nach der Rekonstitution zu einer Trübung im Inhibitor kommen. Diese wirkt sich nicht auf die Leistung des Assays aus.

#### 6.1.2. Präparation der Waschlösung

Den Inhalt der Flasche in 950 mL destilliertes Wasser schütten und homogenisieren. Die verdünnte Lösung ist bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.

### 6.2 Enzymatisches Schritt –Bildung des Angiotensins I

#### 6.2.1 Anmerkungen und Empfehlungen

- Vor dem Zusatz zu den Proben sollte der Enzyminhibitor auf 4 °C abgekühlt werden.
- Beide Inkubationstemperaturen (4 °C und 37 °C) sollten strikt eingehalten werden, da sogar geringe Abweichungen leicht zu falschen Ergebnissen führen können.
- Die Vorinkubation zur enzymatischen Inkubationszeit bei 37 °C sollte so genau wie möglich bestimmt werden und so strikt wie möglich für alle Röhrchen eingehalten werden.
- Die Geschwindigkeit des Temperaturanstieges von 4 °C zu 37 °C und der folgenden Abkühlung ist kritisch. Die Verwendung eines Wasserbades mit Wasserzirkulation für den Temperaturanstieg und eines eisgekühlten Wasserbades für die Abkühlung wird empfohlen.
- Die Geschwindigkeit für Temperaturanstieg und Abkühlung kann durch die Verwendung von Materialien mit hoher Wärmeleitung (Glass) verbessert werden.
- Wenn eine geringe Reninaktivität in den Plasmaproben vermutet wird, kann die Inkubationszeit des enzymatischen Schritts bis 3 Stunden verlängert werden.

#### 6.2.2 Enzymatisches Schritt –Durchführung

**Warnung: Kalibratoren und Kontrollprobe müssen nicht behandelt werden**

- Geben Sie 200 µL des abgekühlten Enzyminhibitors in 200 µL jeder Plasmaprobe und mischen.
- Teilen Sie jede Probe in zwei 200 µL Aliquots.
- Stellen Sie das erste Aliquot in ein eisgekühltes Wasserbad im Kühlschrank (für die Bestimmung des Angiotensins I im Hintergrund, bei 4 °C).
- Stellen Sie das zweite Aliquot eine Stunde in ein 37 °C Wasserbad (für die Bestimmung des erzeugten Angiotensins I bei 37 °C).
- Inkubieren Sie alle Aliquots für eine Stunde.
- Nach der Inkubation, kühlen Sie die Proben schnell von 37 °C zu 4 °C in einem Eiswasserbad.

## 6.3 Testdurchführung

Schritt 1 Zugabe *	Schritt 2 Inkubation	Schritt 3 Messen
Zu den beschichteten Röhrchen, geben Sie, in dieser Reihenfolge: - 75 µL Kalibrator, Kontrolle oder Probe nach der enzymatischen Inkubation bei 37°C und bei 4°C und jeweils - 100 µL Tracer. 1-2 Sekunden vorsichtig vortexen.	2 Stunden lang bei 18-25 °C unter Schütteln (≥ 280 1/min) inkubieren.	Vorsichtig den Inhalt der Röhrchen absaugen (außer den zwei Röhrchen für Totalaktivität). Mit 2 mL Waschlösung waschen und zweimal absaugen. Gebundene cpm (B) und Totalaktivität (T) bestimmen (1 min).

\* Kalibratoren, Kontrolle und Proben müssen vor dem Pipetieren bei 4°C abgekühlt werden. Mischen Sie die Proben vorsichtig vor der Zugabe.

\*\* Fügen Sie 100 µL Tracer in 2 zusätzliche Röhrchen hinzu, um die Totalaktivität zu erhalten.

## 7. ERGEBNISSE

Ergebnisse werden durch Interpolation von der Kalibratorkurve bezogen. Die Kurve dient der Bestimmung der Analytkonzentrationen in Proben, die zum selben Zeitpunkt wie die Kalibratoren gemessen werden.

### 7.1 Standardkurve

Die Ergebnisse wurden in der Abteilung für Qualitätskontrolle anhand einer kubischen Regressions-Kurvenanpassung mit dem Logit von B/T oder B/B0 auf der vertikalen Achse und dem Logarithmus der Analytkonzentration der Kalibratoren auf der horizontalen Achse berechnet.

Andere Berechnungsmethoden ergeben unter Umständen leicht abweichende Ergebnisse.

Totalaktivität : 68 511 cpm				
Kalibratoren	Angiotensin I (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B0(%)
0	0,00	17 444	25,5	100
1	0,30	13 732	20,0	78,7
2	1,00	9 390	13,7	53,8
3	3,00	5 431	7,93	31,1
4	10,0	2 746	4,01	15,7
5	30,0	1 243	1,81	7,13

(Beispiel einer Standardkurve, nicht zur Berechnung benutzen)

### 7.2 Proben

Für Kontrolle oder die Proben nach 4 °C oder 37 °C Inkubation wird der B/T oder B/B0-Wert auf der y-Achse bestimmt und die entsprechende Angiotensin I-Konzentration (in ng/mL) auf der x-Achse abgelesen.

### 7.3 Bestimmung der Plasma Renin Aktivität (PRA)

Die Plasma Renin Aktivität (PRA) wird indirekt bestimmt durch das Messen des in vitro erzeugtes Angiotensins I (A-I) in einer Stunde. Angiotensin I im Hintergrund wird in den bei 4 °C inkubierten Proben bestimmt und von dem bei 37 °C erzeugten Angiotensin I abgezogen. Die PRA wird dann wie folgt ermittelt:

$$PRA \text{ ng of A-I /mL/hr} = \frac{[A-I (37^{\circ}C) - A-I (4^{\circ}C)] \times 2}{\text{Enzymatische Inkubationszeit (hrs)}}$$

mit:

- A-I (37°C): Angiotensinkonzentration in ng/mL in den bei 37°C inkubierten Proben,
- A-I (4°C): Angiotensinkonzentration in ng/mL in den bei 4°C inkubierten Proben.

## 8. QUALITÄTSKONTROLLE

Zur Einhaltung der Laborgrundregeln sollten regelmäßig Kontrollproben benutzt werden, um die Qualität der Ergebnisse zu sichern. Diese Proben müssen in genau derselben Weise wie die Assay-Proben getestet werden, und die Analyse der Ergebnisse sollte mit angebrachten statistischen Methoden stattfinden.

Wenn für die Kontrollen nicht die richtigen Werte ermittelt werden, könnte dies an ungenauem Arbeiten, unvorschriftsmäßigem Umgang mit den Proben oder Verfall der Reagenzien liegen.

Im Falle von Verpackungsschäden oder einer Leistungsbeeinträchtigung des Produkts, kontaktieren Sie bitte Ihren lokalen Vertreter oder benutzen Sie die folgende e-mail: [products.support@diasource.be](mailto:products.support@diasource.be)

Gemäß der EU-Verordnung 2017/746 müssen alle schwerwiegenden Zwischenfälle, die sich im Rahmen der Verwendung dieses Geräts ergeben, an den Hersteller und die zuständige Behörde des EU-Mitgliedstaats, in dem sich der Benutzer und/oder Patient befindet, gemeldet werden.

## 9. ERWARTETE WERTE

Jedes Labor sollte jedoch seinen eigenen Normalbereich in Gruppen von gesunden Testpersonen festlegen. Die hier angegebenen Werte dienen nur als Richtlinie.

N	Normaler Erwachsener	2,5 – 97,5 percentil (ng/mL/hr)	Median (ng/mL/hr)	Min-Max (ng/mL/hr)
38	Frühmorgens, liegend	0,32-1,84	0,79	0,30-1,90
41	2 Stunden aufrecht	0,60-4,18	2,20	0,48-4,88

## 10. SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

(Für mehr Details, siehe die Beilage "APPENDIX")

Repräsentative Daten dienen nur der Veranschaulichung. Die in einzelnen Labors erzielten Leistungen können anders ausfallen.

### 10.1 Empfindlichkeit

10.1.1 Analytische Sensitivität: 0.07 ng/mL

10.1.2 Funktionelle Sensitivität: 0.20 ng/mL

### 10.2 Spezifität

Der in dem Immunassay verwendete Antikörper ist hochspezifisch für Angiotensin I. Gegenüber mehreren Molekülen wurde eine äußerst geringe Kreuzreaktivität beobachtet.

Außerdem werden mögliche Störfaktoren für die PRA Ergebnisse durch die Subtraktion des Hintergrundes vermieden.

### 10.3 Präzision

#### 10.3.1 Intra-assay

Proben aus derselben Serie wurden 25 mal getestet. Der Variationskoeffizient war jeweils weniger oder gleich 11,3 %.

#### 10.3.2 Inter-assay

Proben aus 10 verschiedenen Serien wurden als Doppelbestimmungen getestet. Der Variationskoeffizient war jeweils weniger oder gleich 20,9 %.

### 10.4 Genauigkeit

#### 10.4.1 Abhängigkeit von der enzymatischen Inkubationszeit

Die Proben wurden zusammen mit dem Enzyminhibitor 60, 120 und 180 Minuten inkubiert. Es wurde kein Effekt auf die PRA-Ergebnisse gefunden.

#### 10.4.2 Verdünnungstest

Hoch konzentrierte Plasmaproben wurden mit dem Nullkalibrator seriell verdünnt. Die prozentuale Wiederfindung lag zwischen 78,2 % und 98,8 %.

#### 10.4.3 Wiederfindungstest

Plasmaproben mit geringen Konzentrationen wurden mit bekannten Mengen von Angiotensin I versetzt. Die ermittelten prozentualen Wiederfindungswerte lagen zwischen 104 % und 123 %.

10.5 **Meßbereich** (von analytischer Sensitivität bis zum höchsten Kalibratorwert): 0,07 bis circa 30 ng/mL.

## 11. GRENZEN DES VERFAHRENS

Die Nichtbeachtung der Anweisungen in dieser Packungsbeilage kann die Ergebnisse signifikant beeinflussen.

Die erhaltenen Ergebnisse sind vor dem Hintergrund der gesamten klinischen Situation des Patienten unter Berücksichtigung seiner klinischen Vorgeschichte, den

Ergebnissen anderer Testergebnisse sowie weiteren vorliegenden Informationen zu interpretieren.

Keine hämolytierten, lipämischen oder ikterischen Proben verwenden. Weitere Hinweise dazu finden Sie in Appendix (Anhang), § Interference (Interferenzen).

Bei Immunassays können heterophile Antikörper in der Patientenprobe Interferenzen verursachen. Patienten, die regelmäßig Kontakt mit Tieren hatten oder sich einer Immuntherapie oder diagnostischen Verfahren unter Einsatz von Immunglobulinen oder Immunglobulinfragmenten unterzogen haben, bilden eventuell Antikörper wie z. B. HAMA, die sich störend auf Immunassays auswirken können. Immunassays können außerdem durch das Vorhandensein von Antikörpern gegen Avidin oder Streptavidin sowie von Autoantikörpern gegen den zu bestimmenden Analyten beeinflusst werden. Derartige störende Antikörper können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Die Ergebnisse von Patienten mit Verdacht auf Vorliegen derartiger Antikörper sind mit besonderer Sorgfalt auszuwerten [3, 4, 5].

## 12. LITERATURHINWEISE

1. Funder J W, Carey R M, Mantero F, Murad M H, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young W F Jr. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. May 2016; 101(5): 1889-1916.

2. Bornstein S R, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer G D, Husebye E S, Merke D P, M H Murad, Stratakis C A, Torpy D J. Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. Feb 2016; 101(2): 364-389.

3. J Bjerner et al. - Immunometric Assay Interference - Incidence and Prevention; Clin Chem 48;4; 613-621, 2002

4. L J Kricka - Interferences in Immunoassay - Still a Threat; Clin Chem 46, No. 8, 2000

5. A. Dasgupta: Biotin and Other Interferences in Immunoassays – A Concise Guide. Elsevier, St. Louis, 2019

6. Approved Guideline - Interference Testing in Clinical Chemistry, EP07 3rd Edition. April 2018. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Revision date : 2023-04-21



## APPENDIX

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

#### Interference

Plasma samples containing angiotensin I concentrations (low and high) were spiked with multiple concentrations of the substances listed below and assayed using Angiotensin I RIA KIT. Values were calculated as described in CLSI EP07, 3rd ed. [6]. Interference was determined by testing controls (no interfering substance added) and matched test samples (with interfering substance added). No interference (defined as a shift in dose > 15 %) was found for addition of interferent up to concentration stated in the table below.

Interferent	Test concentration
Biotin	1,631 NG/ML
Conjugated bilirubin	474.4 µG/ML
Hemoglobin	10,044 µG/ML
Triglycerides	15.20 MG/ML
Unconjugated bilirubin	384.3 µG/ML

In spite of hemoglobin, bilirubin (conjugated, unconjugated) and triglyceride interference data in the table, we advise to avoid using hemolyzed, lipemic or icteric samples.

#### Specificity

Analogue	Cross-reactivity (%)
Angiotensin I	100
Angiotensin II	ND
Angiotensin III	ND
Tetradecapeptide	ND
Angiotensinogen	ND

ND = Non-detectable

#### Precision

##### Intra-assay

Sample	P1	P2
Number of determinations	25	25
Pra, ng/ml/hour	1.49	2.94
Cv (%)	11.25	11.25

##### Inter-assay

After generation of Angiotensin I, samples were determined in duplicates in 10 different series according to the procedure of the kit. Plasma renin activity was obtained and used for the calculation of inter-assay precision.

Sample	P1	P2	P3	P4	P5
Number of determinations	10	10	10	10	10
Pra, ng/ml/hour	0.69	3.37	7.08	15.09	24.15
Cv (%)	20.9	9.57	8.72	9.74	11.8

#### Accuracy

##### Dependence on time of enzymatic incubation

No dependence of PRA on time was observed.

Time, minutes		60	120	180
Pra Ng/ml/hour	Sample 1	0.30	0.32	0.33
	Sample 2	0.56	0.48	0.53
	Sample 3	1.04	1.15	1.19
	Sample 4	1.64	1.56	1.65
	Sample 5	5.12	5.19	4.93

#### Dilution test

Samples were diluted in zero calibrator and assayed according to the assay procedure of the kit.

Sample	Dilution Factor	Theoretical conc.	Observed conc.	Recovery (%)
		(NG/ML)		
P1	-	-	2.45	-
	1:2	1.23	1.21	98.78
	1:4	0.61	0.56	91.43
	1:8	0.31	0.27	88.16
P2	-	-	3.05	-
	1:2	1.53	1.46	95.74
	1:4	0.76	0.64	83.93
P3	-	-	9.21	-
	1:2	4.61	4.30	93.38
	1:4	2.30	1.82	79.04
P3	1:8	1.15	0.90	78.18
	1:16	0.58	0.45	78.18

**Recovery test**

Plasma samples were spiked with known quantities of angiotensin I and assayed according to the procedure of the kit.

Initial conc. (ng/ml)	Added angiotensin (ng/ml)	Observed conc. (ng/ml)	Observed addition (ng/ml)	Recovery (%)
0.88	1.01	1.89	2.09	110.7
	1.30	2.18	2.68	122.9
	1.93	2.81	3.20	113.9
1.39	1.01	2.40	2.64	110.2
	1.30	2.69	2.98	110.8
	1.93	3.32	3.59	108.2
1.54	1.01	2.54	2.84	111.7
	1.30	2.84	3.31	116.7
	1.93	3.46	4.03	116.4
2.60	1.01	3.61	3.83	106.2
	1.30	3.90	4.59	117.7
	1.93	4.53	5.20	114.9
2.62	1.01	3.62	3.75	103.5
	1.30	3.92	4.19	107.0
	1.93	4.55	4.82	106.0

**Expected data for children**

Results are sorted according to age.

Children		Angiotensin (ng/ml/hr)				
Upright	N	Min	Max	Median	2.5 <sup>th</sup> percentile	97.5 <sup>th</sup> percentile
2-9 years	27	0.60	7.38	3.20	0.76	6.64
10-15 years	16	0.58	3.98	1.52	0.64	3.93

**<sup>125</sup>I Characteristics**

T<sub>1/2</sub> (<sup>125</sup>I) = 1443 h = 60.14 d

<sup>125</sup> I	E (MeV)	%
γ	0.035	6.5
K <sub>α</sub> X-RAY	0.027	112.5
K <sub>β</sub> X-RAY	0.031	25.4



# Angiotensin I RIA

PT

## RADIO IMUNOENSAIO da angiotensina I para a determinação *in vitro* da Atividade Plasmática da Renina (APR) em plasma humano

### KIPB3518

### Para utilização em diagnóstico *in vitro*

DiaSource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

#### 1. PRINCÍPIO

A angiotensina I RIA é utilizado para a determinação quantitativa da actividade da renina no plasma (APR) por radioimunoensaio do produto da reacção, a angiotensina I.

A geração de angiotensina I é o resultado da clivagem enzimática do substrato de renina, angiotensinogéneo, em amostras de plasma na presença de inibidor de ECA (Enzima de Conversão da Angiotensina), um inibidor enzimático, que bloqueia a conversão de angiotensina I em angiotensina II.

O radioimunoensaio de angiotensina I é um ensaio competitivo. As amostras e os calibradores são incubados com angiotensina I marcada com <sup>125</sup>I, como um detetor, em tubos revestidos com anticorpos policlonais. Após a incubação, o conteúdo dos tubos é enxaguado de forma a remover o detetor marcado com <sup>125</sup>I não ligado. A radioactividade ligada é, em seguida, determinada num contador gama. As concentrações de angiotensina I nas amostras são obtidas por interpolação da curva-padrão. A concentração de angiotensina I nas amostras é indiretamente proporcional à radioactividade.

#### 2. MATERIAIS FORNECIDOS

Todos os reagents fechados no kit são estáveis até à data de validade indicada no rótulo do kit, quando armazenado de 2-8°C. As condições de armazenamento dos reagentes após reconstituição ou diluição são indicadas no parágrafo Procedimento.



**Tubos revestidos com anticorpos policlonais Anti-angiotensina I: 2 x 50 tubos** (pronto a utilizar)

Ag	<sup>125</sup> I
----	------------------

**Marcador de <sup>125</sup>I angiotensina I: um frasco de 11 mL** (pronto a utilizar)

O frasco contém, à data de fabrico, 260 kBq, de angiotensina-I marcado com <sup>125</sup>I em tampão com albumina de soro bovino e um corante.

CAL	N
-----	---

**Calibradores: seis frascos de 1 mL** (prontos a usar)

Os frascos de calibrador contêm entre 0 e aproximadamente 30 ng/mL de angiotensina I em tampão com albumina sérica bovina e azida sódica (<0,1%). A concentração exata está indicada no rótulo de cada frasco. Os calibradores são aferidos em conformidade com o padrão internacional 86/536.

CONTROL
---------

**Controlo: um frasco de 1 mL** (pronto a usar)

O frasco contém angiotensina I em tampão com albumina sérica bovina e azida sódica (<0,1%). O intervalo de medição analítico é indicado num suplemento. A amostra de controlo é aferida em conformidade com o padrão internacional 86/536.

NEUTR	SOLN
-------	------

**Inibidor Enzimático: um frasco** (liofilizado)

O inibidor contém azida sódica (<0,1%).

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

**Solução de Lavagem (20x): um frasco de 50 mL**

A solução concentrada deve ser diluída antes de ser utilizada.

#### 3. MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Em adição ao material usual de laboratório, é ainda necessário:

- Micropipeta de precisão (75 µL).
- Pipeta semiautomática (100 µL, 200 µL, 2 mL).
- Banho de água.
- Banho de gelo.
- Agitador tipo Vortex.
- Agitador capaz.
- Sistema de Aspiração.
- Contador gama calibrado para <sup>125</sup>I.

#### 4. AVISOS E PRECAUÇÕES

##### 4.1 Orientações Gerais:

- A solução inibidora enzimática, calibradores, controlo e amostras devem ser arrefecidos a 2-8 °C antes da pipetagem.
- Os frascos dos calibradores e controlos devem estar abertos durante o menor tempo possível, de forma a evitar evaporação excessiva.
- Não misture os reagentes de kits de diferentes lotes.
- Deve ser estabelecida uma curva padrão em cada ensaio.
- Recomenda-se a realizar o imunoensaio em duplicado.
- Cada tubo deve ser utilizado uma vez.

##### 4.2 Regras básicas de segurança para radiação

A compra, uso e transferência de material radioactivo estão sujeitos à regulamentação de cada país. A adesão às regras básicas de segurança para a radiação fornecem a protecção adequada:

- Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos na presença de materiais radioactivos.
- Não pipetar o material radioactivo com a boca.
- Evite qualquer contacto com o material radioactivo utilizando-se luvas e EPI's de laboratório.
- Toda a manipulação de material radioactivo deve ser feita em local apropriado, distante de corredores e locais muito utilizados.
- Materiais radioactivos devem ser armazenados no frasco fornecido e em área designada.
- O registro de recepção e armazenamento de produtos radioactivos devem ser mantidos atualizados.
- Equipamentos laboratoriais e vidrarias que estão sujeitas à contaminação devem ser separados para prevenir a contaminação cruzada de radioisótopos diferentes.
- Cada caso de contaminação ou perda de material radioactivo deve ser efetuada de acordo com os procedimentos estabelecidos.
- Descarte dos reagentes e materiais deve ser de acordo com a regulamentação aplicável.

##### 4.3 Azida Sódica

Alguns reagentes contêm azida sódica como conservante. A azida sódica pode reagir com chumbo, cobre ou latão para formar azidas metálicas explosivas. A eliminação de azida sódica deve ser efetuada de acordo com as normas locais apropriadas.

##### 4.4 Materiais de origem humana

Os materiais de origem humana, contidos neste kit, foram considerados negativos para a presença de anticorpos para VIH 1 e VIH 2, anticorpos anti-HCV, bem como para o antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg). No entanto, devem ser tratados como potencialmente infectantes. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer total garantia de que nenhum vírus está presente. Lidar com esse kit com todas as precauções necessárias.

Todos os espécimes de pacientes devem ser tratados como potencialmente infecciosos e os resíduos devem ser eliminados de acordo com as regras do país.

#### 5. COLHEITA, PROCESSAMENTO, ARMAZENAMENTO, E DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS

- As amostras de plasma têm de ser recolhidas em tubos EDTA frios.
- Separar o plasma das células por centrifugação a 2-8 °C.
- Mantenha as amostras de plasma congelado (<-20 °C, um ano no máximo), se a determinação não é para ser executada imediatamente, depois de alíquotar, a fim de evitar o congelamento e descongelamento repetido.

Nota: A temperatura de amostras de plasma devem ser mantidos a 2-8 °C no decurso do ensaio. Evitar manipulação adicional para evitar, tanto a formação como a decomposição da angiotensina I.

- Qualquer amostra com valor superior ao calibrador mais alto deve ser diluída com o calibrador zero.

## 6. PROCEDIMENTO

### 6.1 Preparação dos Reagentes

#### 6.1.1 Preparação da solução de inibidor enzimático

O conteúdo do frasco é reconstituído com o volume de água destilada fria (4 °C) indicado na respetiva etiqueta e misturado. O inibidor enzimático reconstituído pode ser armazenado a 2-8 °C até à data de validade do kit.

A presença ocasional de turvação no inibidor após reconstituição não afeta o desempenho do ensaio.

#### 6.1.2. Preparação de solução de lavagem

Misture o conteúdo do frasco em 950 mL de água destilada e homogenize. A solução diluída deve ser armazenada entre 2-8 °C até a data validade do kit.

### 6.2 Passo enzimático – geração da angiotensina I

#### 6.2.1 Observações e recomendações

- O inibidor enzimático tem de ser arrefecido até 4 °C antes da adição à amostra.
- Ambas as temperaturas de incubação (4 °C e 37 °C) devem ser respeitadas rigorosamente, mesmo pequenas variações podem causar erros graves na determinação.
- O tempo de incubação enzimática a 37 °C deve ser determinada de forma tão precisa quanto possível e mantido dentro de limites estreitos para todo o conjunto de tubos.
- A rapidez do aumento da temperatura de 4 °C a 37 °C e a seguinte queda inversa são críticas. Um banho de água circulante é conveniente para o aquecimento e, a utilização de um banho de água gelada é aconselhável para o arrefecimento.
- A rapidez do aumento de temperatura e diminuição pode ser melhorada com a utilização de tubos feitos de material com boa condutividade térmica (vidro).
- Se for esperado baixa actividade da renina plasmática da amostra, o tempo de incubação do passo enzimático pode ser prolongado até 3 horas.

#### 6.2.2 Passo enzimático - Procedimento

**Atenção: Não tratar os calibradores e o controlo.**

- Adicionar 200 µL de inibidor enzimático pré-arrefecido para 200 µL a cada amostra de plasma e misturar.
- Divida cada amostra em duas alíquotas de 200 µL.
- Colocar a primeira alíquota num banho de água gelada no frigorífico (destinada à determinação de fundo angiotensina I, a 4 °C).
- Colocar a segunda num banho de água regulada para 37 °C (destinada à determinação da angiotensina I gerada a 37 °C).
- Incubar todas as alíquotas durante 1 hora.
- Após incubação, arrefeça as amostras de 37 °C a 4 °C rapidamente usando banho de água gelada.

### 6.3 Procedimento de Ensaio

Passo 1 Pipetagem*	Passo 2 Incubação	Passo 3 Contagem
Nos tubos revestidos, adicione sucessivamente:  75 µL de calibrador, controlo ou amostra após a incubação enzimática a 37 °C e a 4 °C respectivamente 100 L de marcador.**  Agite suavemente em Vortex 1-2 segundos.	Incubar 2 horas a 18-25 °C com agitação (> 280 rpm).	Aspirar o conteúdo dos tubos com cuidado (excepto os 2 tubos "total cpm")  Lavar com 2 mL de solução de lavagem. Aspirar 2 vezes.  Proceda à contagem do cpm ligado (B) e do cpm total (T) durante 1 minuto.

\*Amostras, calibradores e controlo têm de ser arrefecidos a 4 °C antes da pipetagem. Misture delicadamente as amostras antes de serem adicionados.

\*\*Adicione 100 µL do traçador a 2 tubos adicionais para obter o «total cpm»

## 7. RESULTADOS

Os resultados são obtidos a partir da curva do calibrador por interpolação. A curva serve para determinar as concentrações de analito em amostras medidas ao mesmo tempo que os calibradores.

### 7.1 Curva Padrão

Os resultados do departamento de controlo de qualidade foram calculados utilizando um ajuste de curva de regressão cúbica com logit de

B/T ou B/B0 no eixo vertical e registo da concentração de analito dos calibradores no eixo horizontal. Outros métodos de cálculo podem produzir resultados ligeiramente diferentes.

Actividade total : 68 511 cpm				
Calibradores	Angiotensina I (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B0 (%)
0	0.00	17 444	25.5	100
1	0.30	13 732	20.0	78.7
2	1.00	9 390	13.7	53.8
3	3.00	5 431	7.93	31.1
4	10.0	2 746	4.01	15.7
5	30.0	1 243	1.81	7.13

(Exemplo de curva padrão, não utilize para cálculo)

### 7.2 Amostras

Para o controlo e as amostras incubadas a 4 °C, ou a 37 °C, localizar a B/T ou B/B0 valor no eixo vertical e a leitura da concentração de angiotensina I correspondente em ng/mL no eixo horizontal.

### 7.3 Cálculo da actividade da renina no plasma

A determinação da actividade da renina no plasma é efectuada indirectamente pela medição da geração in vitro de angiotensina I (A-I) por hora. Os valores de AI, determinados com amostras de plasma incubadas a 4 °C, são subtraídos a partir do AI gerado a 37 °C para o cálculo da APR utilizando a seguinte equação:

$$APR \text{ ng de A-I / mL/hr} = \frac{[A-I (37^\circ C) - A-I (4^\circ C)] \times 2}{\text{Tempo da Incubação Enzimática (hrs)}}$$

Onde

A-I (37 °C): concentração de angiotensina em ng/mL na amostra incubada a 37 °C

A-I (4 °C) : concentração de angiotensina em ng/mL na amostra incubada a 4 °C.

## 8. CONTROLO DE QUALIDADE

As boas práticas de laboratório implicam a execução regular do controlo para garantir a qualidade dos resultados obtidos. Estes controlos devem ser processados exactamente como as amostras do ensaio, e é recomendado que os seus resultados sejam analisados utilizando um método estatístico adequado.

A falha na obtenção de valores apropriados para os controlos pode indicar manipulação imprecisa, manuseamento inadequado de amostras ou deterioração dos reagentes.

Em caso de deterioração da embalagem ou se o dado obtido mostrar alguma alteração de performance, por favor contacte o distribuidor local ou utilize o seguinte endereço de e-mail: [products.support@diasource.be](mailto:products.support@diasource.be)

De acordo com o regulamento da UE 2017/746, qualquer incidente grave que tenha ocorrido em relação ao dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e à autoridade competente do estado-membro da UE em que o utilizador e/ou o paciente se encontra.

## 9. VALORES ESPERADOS

Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores normais. O valor abaixo indicado foi determinado numa população de dadores normais e é meramente indicativo.

N	Adultos saudáveis	2.5 - 97.5 percentile (ng/mL/hr)	Mediana (ng/mL/hr)	Min-Max (ng/mL/hr)
38	Manhã, pos. Decúbito	0.32-1.84	0.79	0.30-1.90
41	Pos. ortostática, 2 Horas	0.60-4.18	2.20	0.48-4.88

## 10. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

(Para mais detalhes, veja a data sheet "APPENDIX")

São fornecidos dados representativos apenas para fins ilustrativos. O desempenho pode variar de um laboratório para outro.

## 10.1 Sensibilidade

10.1.1 Sensibilidade analítica: 0,07 ng/mL

10.1.2 Sensibilidade funcional: 0,20 ng/mL

## 10.2 Especificidade

O anticorpo utilizado no imunoensaio é altamente específico para angiotensina I. Foi obtida uma reatividade cruzada extremamente baixa contra várias moléculas.

Além disso, a influência de possíveis interferências nos resultados na PRA é eliminado por subtração do valor de fundo.

## 10.3 Precisão

### 10.3.1 Intra-ensaio

As amostras foram doseadas em 25 repetições da mesma série. Os coeficientes de variação encontrados foram inferiores ou igual a 11,3%.

### 10.3.2 Inter-ensaio

As amostras foram analisadas em duplicado, em 10 séries diferentes. Os coeficientes de variação encontrados foram inferiores ou igual a 20,9%.

## 10.4 Exactidão

### 10.4.1 Dependência do tempo de incubação enzimática

As amostras foram incubadas com um inibidor enzimático durante 60, 120, e 180 minutos. Nenhum efeito significativo nos resultados PRA foi encontrado.

### 10.4.2 Teste de Diluição

Foram diluídas amostras de plasma altamente concentradas em série com o calibrador zero. As percentagens de recuperação obtidas variaram entre 78,2% e 98,8%.

### 10.4.3 Teste de Recuperação

As amostras de concentração baixa de plasma foram misturadas com quantidades conhecidas de angiotensina I. As percentagens de recuperação obtidas variaram entre 104% e 123%.

## 10.5 Intervalo de medição (da sensibilidade analítica ao calibrador mais alto):

0,07 a aproximadamente 30 ng/mL.

## 11. LIMITAÇÕES

O não cumprimento das instruções deste protocolo pode afectar significativamente os resultados.

Os resultados devem ser interpretados conjuntamente com a clínica do doente, incluindo história clínica, dados de testes adicionais e outras informações apropriadas.

Não utilize amostras hemolisadas, lipémicas ou ictericas. Para obter mais detalhes, consulte Appendix (Anexo), § Interference (Interferência).

Em imunoensaios, existe a possibilidade de interferência por anticorpos heterófilos na amostra do paciente. Os pacientes que tenham sido expostos regularmente a animais ou que tenham sido submetidos a imunoterapia ou procedimentos de diagnóstico utilizando imunoglobulina ou respetivos fragmentos podem produzir anticorpos, por exemplo HAMA, que interferem com os imunoensaios. Os imunoensaios também podem ser afetados pela presença de anticorpos antiavidina ou antiestreptavidina, assim como pela presença de autoanticorpos direcionados contra o analito determinado. Estes anticorpos interferentes podem produzir resultados erróneos. Os resultados de pacientes suspeitos de terem estes anticorpos devem ser avaliados com cuidado [3, 4, 5].

## 12. REFERÊNCIAS

1. Funder J W, Carey R M, Mantero F, Murad M H, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young W F Jr. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. May 2016; 101(5): 1889-1916.
2. Bornstein S R, Allolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer G D, Husebye E S, Merke D P, M H Murad, Stratakis C A, Torpy D J. Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. Feb 2016; 101(2): 364-389.
3. J Bjerner et al. - Immunometric Assay Interference - Incidence and Prevention; Clin Chem 48;4; 613-621, 2002
4. L J Kricka - Interferences in Immunoassay - Still a Threat; Clin Chem 46, No. 8, 2000
5. A. Dasgupta: Biotin and Other Interferences in Immunoassays – A Concise Guide. Elsevier, St. Louis, 2019
6. Approved Guideline - Interference Testing in Clinical Chemistry, EP07 3rd Edition. April 2018. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Revision date : 2023-04-21

## APPENDIX

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

#### Interference

Plasma samples containing angiotensin I concentrations (low and high) were spiked with multiple concentrations of the substances listed below and assayed using Angiotensin I RIA KIT. Values were calculated as described in CLSI EP07, 3rd ed. [6]. Interference was determined by testing controls (no interfering substance added) and matched test samples (with interfering substance added). No interference (defined as a shift in dose > 15 %) was found for addition of interferent up to concentration stated in the table below.

Interferent	Test concentration
Biotin	1,631 NG/ML
Conjugated bilirubin	474.4 µG/ML
Hemoglobin	10,044 µG/ML
Triglycerides	15.20 MG/ML
Unconjugated bilirubin	384.3 µG/ML

In spite of hemoglobin, bilirubin (conjugated, unconjugated) and triglyceride interference data in the table, we advise to avoid using hemolyzed, lipemic or icteric samples.

#### Specificity

Analogue	Cross-reactivity (%)
Angiotensin I	100
Angiotensin II	ND
Angiotensin III	ND
Tetradecapeptide	ND
Angiotensinogen	ND

ND = Non-detectable

#### Precision

##### Intra-assay

Sample	P1	P2
Number of determinations	25	25
Pra, ng/ml/hour	1.49	2.94
Cv (%)	11.25	11.25

##### Inter-assay

After generation of Angiotensin I, samples were determined in duplicates in 10 different series according to the procedure of the kit. Plasma renin activity was obtained and used for the calculation of inter-assay precision.

Sample	P1	P2	P3	P4	P5
Number of determinations	10	10	10	10	10
Pra, ng/ml/hour	0.69	3.37	7.08	15.09	24.15
Cv (%)	20.9	9.57	8.72	9.74	11.8

#### Accuracy

##### Dependence on time of enzymatic incubation

No dependence of PRA on time was observed.

Time, minutes		60	120	180
Pra Ng/ml/hour	Sample 1	0.30	0.32	0.33
	Sample 2	0.56	0.48	0.53
	Sample 3	1.04	1.15	1.19
	Sample 4	1.64	1.56	1.65
	Sample 5	5.12	5.19	4.93

#### Dilution test

Samples were diluted in zero calibrator and assayed according to the assay procedure of the kit.

Sample	Dilution Factor	Theoretical conc.	Observed conc.	Recovery (%)
		(NG/ML)		
P1	-	-	2.45	-
	1:2	1.23	1.21	98.78
	1:4	0.61	0.56	91.43
	1:8	0.31	0.27	88.16
P2	-	-	3.05	-
	1:2	1.53	1.46	95.74
	1:4	0.76	0.64	83.93
	1:8	0.38	0.34	89.18
P3	-	-	9.21	-
	1:2	4.61	4.30	93.38
	1:4	2.30	1.82	79.04
	1:8	1.15	0.90	78.18
	1:16	0.58	0.45	78.18

**Recovery test**

Plasma samples were spiked with known quantities of angiotensin I and assayed according to the procedure of the kit.

Initial conc. (ng/ml)	Added angiotensin (ng/ml)	Observed conc. (ng/ml)	Observed addition (ng/ml)	Recovery (%)
0.88	1.01	1.89	2.09	110.7
	1.30	2.18	2.68	122.9
	1.93	2.81	3.20	113.9
1.39	1.01	2.40	2.64	110.2
	1.30	2.69	2.98	110.8
	1.93	3.32	3.59	108.2
1.54	1.01	2.54	2.84	111.7
	1.30	2.84	3.31	116.7
	1.93	3.46	4.03	116.4
2.60	1.01	3.61	3.83	106.2
	1.30	3.90	4.59	117.7
	1.93	4.53	5.20	114.9
2.62	1.01	3.62	3.75	103.5
	1.30	3.92	4.19	107.0
	1.93	4.55	4.82	106.0

**Expected data for children**

Results are sorted according to age.

Children		Angiotensin (ng/ml/hr)				
Upright	N	Min	Max	Median	2.5 <sup>th</sup> percentile	97.5 <sup>th</sup> percentile
2-9 years	27	0.60	7.38	3.20	0.76	6.64
10-15 years	16	0.58	3.98	1.52	0.64	3.93

**<sup>125</sup>I Characteristics**

T<sub>1/2</sub> (<sup>125</sup>I) = 1443 h = 60.14 d

<sup>125</sup> I	E (MeV)	%
γ	0.035	6.5
K <sub>α</sub> X-RAY	0.027	112.5
K <sub>β</sub> X-RAY	0.031	25.4



# Angiotensin I RIA

RU

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНГИОТЕНЗИНА I  
ДЛЯ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ ПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕНИНА (АПР) IN VITRO В ПЛАЗМЕ

KIPB3518

## IN VITRO ДИАГНОСТИКИ

DiaSource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

### 1. ПРИНЦИП РАБОТЫ

Радиоиммунологический метод оценки активности плазматического ренина (АПР) основан на измерении количества образовавшегося продукта ферментативной реакции - ангиотензина I.

Образование ангиотензина I в образцах плазмы крови, являющееся результатом ферментативного расщепления субстрата ренина

- ангиотензиногена, проводится в присутствии ингибитора, блокирующего превращение ангиотензина I в ангиотензин II.

Радиоиммунологический анализ ангиотензина I является конкурентным тестом. Пробы и калибраторы инкубируются с ангиотензином I, меченным <sup>125</sup>I, как индикаторной добавкой, в пробирках, покрытых поликлональными антителами. После инкубации содержимое пробирок промывают, чтобы удалить несвязанную индикаторную добавку, меченную <sup>125</sup>I. Связанную радиоактивность затем определяют на гамма-счетчике. Значения концентрации ангиотензина I в пробах получают путем интерполяции с использованием стандартной кривой. Концентрация ангиотензина I в пробах не прямо пропорциональна радиоактивности.

### 2. ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Все реагенты стабильны при 2-8°C до окончания срока годности набора, указанного на упаковке. Сроки годности, указанные на этикетках флаконов с реагентами, относятся только к их хранению в производственных условиях вплоть до момента комплектации набора и не распространяются на полученную заказчиком продукцию.

Условия хранения реагентов после их восстановления или разведения указаны в разделе «Процедура».



**Пробирки, покрытые поликлональными антителами к ангиотензину I: 2 x 50 шт (готовы к использованию)**

Ag	125I
----	------

**Метка, <sup>125</sup>I-ангиотензин I: 1 флакон, 11 мл (готова к использованию)**

На дату изготовления флакон содержит 260 кБк <sup>125</sup>I-ангиотензина I в буфере с бычьим сывороточным альбумином и красителем.

CAL	N
-----	---

**Калибровочные пробы: 6 флаконов по 1 мл (готовы к использованию)**

Флаконы калибратора содержат от 0 до приблизительно 30 нг/мл ангиотензина I в буфере с бычьим сывороточным альбумином и азидом натрия (<0,1%). Точная концентрация указана на этикетке каждого флакона. Калибраторы прослеживаются до международного стандарта 86/536.

CONTROL
---------

**Контрольная сыворотка: 1 флакон, 1 мл (готова к использованию)**

Флакон содержит ангиотензин I в буфере с бычьим сывороточным альбумином и азидом натрия (<0,1%). Ожидаемые диапазоны концентраций указаны в дополнении. Контрольный образец прослеживается до международного стандарта 86/536.

NEUTR	SOLN
-------	------

**Ингибитор фермента: 1 флакон (лиофилизированный препарат)**

Ингибитор содержит азид натрия (<0,1%).

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

**Промывочный раствор (20x): 1 флакон, 50 мл**

Концентрированный раствор требуется развести перед использованием.

### 3. НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Помимо стандартного лабораторного оборудования необходимо иметь следующее:

- Прецизионная микропипетка (75 мкл).
- Полуавтоматическая пипетка (100 мкл, 200 мкл и 2 мл).
- Водяная ванна.
- Ледяная ванна.
- Вихревой смеситель типа vortex.
- Горизонтальный или орбитальный встряхиватель.
- Водоструйный насос.
- Гамма-счетчик для измерения активности <sup>125</sup>I.

### 4. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

#### 4.1 Общие замечания:

- Перед внесением в пробирки раствор ингибитора фермента, калибровочные, контрольные и анализируемые образцы должны иметь температуру 2-8°C.
- Флаконы с калибраторами и контролями следует открывать непосредственно перед использованием, во избежание чрезмерного испарения.
- Не смешивать реагенты из наборов разных серий.
- Анализ калибровочных и исследуемых проб должен проводиться одновременно.
- Анализ рекомендуется проводить в дубликатах.
- Пробирки только для одноразового применения.

#### 4.2 Основные правила радиационной безопасности

- Получение, использование и транспортировка радиоактивных материалов должны происходить в соответствии с принятыми в данной стране нормами радиационной безопасности и санитарными правилами работы с радиоактивными веществами.
- В лабораториях запрещается принимать пищу, курить, пользоваться косметикой.
  - Не пипетировать растворы радиоактивных веществ ртом.
  - Для ограничения контакта с радиоактивными материалами рекомендуется использовать разовые перчатки и лабораторную спецодежду.
  - Все манипуляции с радиоактивными веществами следует проводить в специально оборудованных для этого помещениях, удаленных от мест постоянного пребывания людей.
  - Радиоактивные вещества следует хранить с использованием контейнеров в специально отведенных для этого местах.
  - Необходимо регистрировать поступление и расход радиоактивных материалов.
  - Лабораторное оборудование и посуду следует хранить отдельно, чтобы предотвратить их загрязнение радиоактивными изотопами.
  - Любой случай радиоактивного загрязнения или исчезновения радиоактивного материала должен рассматриваться в соответствии с законодательством.
  - Утилизация радиоактивных отходов должна осуществляться в соответствии с законодательством.

#### 4.3 Азид натрия

Некоторые реагенты в качестве консерванта содержат азид натрия. Азид натрия способен реагировать со свинцом, медью или латунью с образованием взрывчатых азидов металла. Утилизация азидов натрия следует проводить в соответствии с соответствующими местными нормами.

#### 4.4 ProClin 300

R43: Может вызвать сенсибилизацию путем контакта с кожей.



#### 4.5 Материал человеческого происхождения

Материал человеческого происхождения, входящий в состав компонентов набора, не содержит антител к HIV 1, HIV 2, HCV и к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBsAg). Тем не менее, ни один из существующих методов анализа не может гарантировать полного отсутствия инфекционных агентов в исследуемом материале. Поэтому при работе с компонентами набора следует соблюдать необходимые меры предосторожности.

Со всеми образцами пациентов следует обращаться как с потенциально инфицированными материалами, а отходы следует утилизировать в соответствии с законодательством страны.

#### 5. СБОР, ОБРАБОТКА, ХРАНЕНИЕ И РАЗВЕДЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

- Собрать кровь в охлажденные пробирки с ЭДТА.
  - Отделить плазму центрифугированием при 2-8°C.
  - Если анализ не будет проводиться немедленно, образцы плазмы следует разделить на аликвоты и заморозить при температуре <-20°C, (до 1 года). Избегать повторного замораживания-оттаивания образцов.
- Внимание: В процессе получения и обработки образцов температура плазмы должна поддерживаться на уровне 2-8°C. Строгое соблюдение рекомендуемых условий позволяет предотвратить как образование, так и расщепление ангиотензина I.
- Если концентрация в образце превышает значение концентрации максимального калибратора, образец следует развести нулевым калибратором.

#### 6. ПРОЦЕДУРА

##### 6.1 Подготовка реагентов

###### 6.1.1 Подготовка раствора ингибитора фермента

Содержание флакона восстановлено объемом холодной дистиллированной воды (4°C), указанным на этикетке, и перемешано. Восстановленный энзиматический ингибитор можно хранить при температуре 2-8°C до истечения срока годности набора. Эпизодическое помутнение ингибитора после разведения не влияет на эксплуатационные характеристики теста.

###### 6.1.2 Приготовление промывочного раствора

Тщательно смешать содержимое флакона с концентратом и 950 мл дистиллированной воды. Подготовленный к работе промывочный раствор можно хранить при 2-8°C до окончания срока годности набора.

##### 6.2 Ферментативная стадия – образование ангиотензина I

###### 6.2.1 Замечания и рекомендации

- Раствор ингибитора фермента должен быть охлажден до 4°C перед внесением в анализируемые образцы.
- Температурные условия тепловой и холодной инкубаций (4°C и 37°C) должны строго соблюдаться, так как даже небольшие отклонения от рекомендуемого режима могут привести к серьезным искажениям результатов анализа.
- Продолжительность энзиматической стадии (инкубация при 37°C) должна соблюдаться как можно более тщательно и быть практически одинаковой для всех пробирок.
- Скорость нагрева пробирок до 37°C и последующего их охлаждения имеет принципиальное значение. Для нагрева рекомендуется использовать водяную баню с циркуляцией воды, а для охлаждения – ледяную баню.
- Для ускорения процессов нагрева и охлаждения рекомендуется использовать пробирки из материала, обладающего хорошей теплопроводностью (стекло).
- Продолжительность тепловой инкубации в образцах с предполагаемой низкой активностью плазматического ренина можно увеличить до 3 часов.

###### 6.2.2 Энзиматическая стадия

**Внимание: Не обрабатывать калибровочные и контрольные пробы.**

- В пробирки внести 200 мкл анализируемых образцов плазмы и добавить к ним по 200 мкл охлажденного раствора ингибитора. Тщательно перемешать.
- Разделить содержимое каждой пробирки на две аликвоты по 200 мкл.
- Поставить пробирки с первой группой аликвот на ледяную баню и поместить ее в холодильник. Данная группа пробирок предназначена для определения базового уровня ангиотензина I при 4°C.

- Вторую группу пробирок, в которых будет оцениваться скорость образования ангиотензина I, поместить на водяную баню при температуре 37°C.
- Инкубировать все пробы в течение 1 часа.
- После окончания инкубации при 37°C быстро охладить пробы до 4°C на ледяной бане.

#### 6.3 Процедура анализа

Стадия 1 Внесение реагентов *	Стадия 2 Инкубация	Стадия 3 Измерение результатов
<i>В пробирки с покрытием последовательно внести:</i>  75 мкл калибровочных, контрольных и анализируемых проб, прошедших энзиматическую стадию при 37°C и 4°C, а также 100 мкл метки.**	Инкубируют в течение 2 часов при температуре 18-25°C встряхиванием (≥280 об/мин).	Тщательно удалить содержимое пробирок (кроме проб «Т») Промыть пробирки 2 мл промывочного раствора.  Удалить жидкость. Дважды повторить процедуру аспирации.  Измерить связанную (В) и общую (Т) активность <sup>125</sup> I в течение 1 минуты.

\* Перед внесением в пробирки калибровочные, контрольные и анализируемые пробы должны быть охлаждены до температуры 4°C и аккуратно перемешаны.

\*\* В две дополнительные пробирки внести по 100 мкл метки для оценки общей активности <sup>125</sup>I (Т), имп./мин.

#### 7. РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты получены по калибровочной кривой путем интерполяции. Кривая служит для определения концентраций аналита в пробах, анализ которых выполнен одновременно с калибраторами.

##### 7.1 Калибровочная кривая

Результаты в отделении контроля качества рассчитаны с использованием подбора кривой кубической регрессии с логит В/Т или В/В0 по вертикальной оси и логарифмом концентрации аналита калибраторов по горизонтальной оси.

Другие способы вычисления могут дать немного отличающиеся результаты.

Общий счет : 68 511 имп./мин.				
Калибровочные пробы	Ангиотензин I (нг/мл)	Имп./мин. (n=3)	В/Т (%)	В/В0 (%)
0	0,00	17 444	25,5	100
1	0,30	13 732	20,0	78,7
2	1,00	9 390	13,7	53,8
3	3,00	5 431	7,93	31,1
4	10,0	2 746	4,01	15,7
5	30,0	1 243	1,81	7,13

(Пример типичной калибровочной кривой. Не использовать для обсчета результатов.)

##### 7.2 Образцы

Для каждого контрольного и анализируемого образца, прошедшего инкубацию при 4°C и 37°C, найти на вертикальной оси калибровочного графика значение В/Т (%) или В/В0 (%), а на горизонтальной оси - соответствующую концентрацию ангиотензина I в нг/мл.

##### 7.3 Расчет активности плазматического ренина

Для каждого контрольного и анализируемого образца, прошедшего инкубацию при 4°C и 37°C, найти на вертикальной оси калибровочного графика значение В/Т или В/В0, а на горизонтальной оси - соответствующую концентрацию ангиотензина I в нг/мл.

. Расчет активности плазматического ренина  
Определение активности плазматического ренина проводится непрямым методом по количеству ангиотензина I (А-I), образовавшегося in vitro в течение часа. Базовый уровень А-I в пробах, прошедших инкубацию при 4°C, вычитается из уровня А-I, образовавшегося при 37°C, а расчет активности плазматического ренина проводится по формуле:

$$\text{АГР (нг А-І /мл/час)} = \frac{[A-I(37^{\circ}\text{C}) - A-I(4^{\circ}\text{C})] \times 2}{\text{Длительность энзиматической стадии (час)}}$$

Где:

**A-I (37°C):** концентрация ангиотензина (нг/мл) после инкубации при 37°C

**A-I (4°C):** концентрация ангиотензина (нг/мл) после инкубации при 4°C.

## 8. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с требованиями Надлежащей лабораторной практики для контроля качества проводимых исследований следует регулярно использовать контрольные образцы, которые должны проходить те же стадии анализа, что и анализируемые пробы. Результаты контроля качества рекомендуется обрабатывать с помощью специальных статистических методов.

Отклонение результатов исследования контрольных образцов от заданных значений может свидетельствовать о технических ошибках, неправильной подготовке образца или повреждении реагентов.

В случае серьезного повреждения упаковки, или в случае несоответствия полученных результатов аналитическим характеристикам обратитесь, пожалуйста, к нашим специалистам. E-mail: [products.support@diasource.be](mailto:products.support@diasource.be)

Согласно Регламенту ЕС 2017/746, о любом серьезном инциденте, произошедшем в отношении этого устройства, следует сообщить изготовителю и компетентному органу государства-члена ЕС, в котором находится пользователь и/или пациент.

## 9. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В каждой лаборатории рекомендуется установить собственные референсные значения. Представленные ниже значения, полученные на пробах здоровых субъектов, приводятся только для сведения.

N	Взрослые	2,5-й – 97,5-й перцентиль (нг/мл/ч)	Медиана (нг/мл/ч)	Min-Max (нг/мл/ч)
38	Ранним утром, в положении лежа	0,32-1,84	0,79	0,30-1,90
41	В положении стоя, 2 часа	0,60-4,18	2,20	0,48-4,88

Подробная информация о ожидаемых значениях педиатрических образцов (отсортированных по возрасту) приведены в разделе appendix.

## 10. ЭКСПЛУАТАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

*(Более подробная информация приведена в разделе "APPENDIX")*

Репрезентативные данные предоставлены исключительно для пояснений. Показатели, полученные в конкретной лаборатории, могут отличаться.

### 10.1 Чувствительность

**10.1.1 Аналитическая чувствительность:** 0,07 нг/мл

**10.1.2 Функциональная чувствительность:** 0,20 нг/мл

### 10.2 Специфичность

Антитело, используемое в иммунохимическом анализе, является высокоспецифичным для ангиотензина I. Была получена чрезвычайно низкая перекрестная реактивность в отношении нескольких молекул. Кроме того, вычитание базового уровня ангиотензина I исключает влияние посторонних факторов на оценку АГР.

### 10.3 Воспроизводимость

#### 10.3.1 Внутри анализа

Анализ образцов проводили в 25 репликатах в пределах одной серии определений. Коэффициент вариации не превышал 11,3%.

#### 10.3.2 Между анализами

нализ образцов в дубликатах проводили в 10 различных сериях определений. Коэффициент вариации не превышал 20,9%.

### 10.4 Точность

#### 10.4.1 Зависимость от продолжительности энзиматической стадии

Образцы плазмы инкубировали в присутствии ингибитора фермента в течение 60, 120 и 180 минут. Никакого влияния на результаты анализа по оценке АГР не выявлено.

### 10.4.2 Тест на разведение

Пробы плазмы с высокой концентрацией последовательно разводили в нулевом калибраторе. Полученный процент восстановления находился в пределах от 78,2% до 98,8%.

### 10.4.3 Тест на «открытие» стандартной добавки

В пробы плазмы с низкой концентрацией аналита были добавлены известные количества ангиотензина I. Полученные значения процента восстановления составили от 104% до 123%.

**10.5 Диапазон** (от предела аналитической чувствительности до калибратора с самой высокой концентрацией): от 0,07 до приблизительно 30 нг/мл.

## 11. ОГРАНИЧЕНИЯ

Несоблюдение этих Инструкций по применению (IFU) может привести к искажению результатов исследования.

Результаты определения должны быть интерпретированы в свете общей клинической картины пациента, включая анамнез, данные других тестов и подходящую иную информацию.

Не используйте гемолизированные, липемические или иктерические пробы. Для получения более подробной информации см. Appendix (Приложение), § Interference (Интерференция).

Для иммунохимических тестов существует вероятность интерференции гетерофильными антителами в пробе пациента. У пациентов, имеющих постоянный контакт с животными или проходивших иммунотерапию, или диагностические процедуры с использованием иммуноглобулинов или их фрагментов, могут вырабатываться антитела, например НАМА, которые влияют на результаты иммунохимического анализа. На результаты иммунохимического анализа может также повлиять наличие антител к авидину или антистрептавидину и аутоантител, направленных против определяемого аналита. Такие интерферирующие антитела могут приводить к получению ошибочных результатов. Тщательно проверяйте результаты пациентов с подозрением на наличие этих антител [3, 4, 5].

## 12. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Funder J W, Carey R M, Mantero F, Murad M H, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young W F Jr. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. May 2016; 101(5): 1889-1916.
- Bornstein S R, Alolio B, Arlt W, Barthel A, Don-Wauchope A, Hammer G D, Husebye E S, Merke D P, M H Murad, Stratakis C A, Torpy D J. Diagnosis and Treatment of Primary Adrenal Insufficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab. Feb 2016; 101(2): 364-389.
- J Bjerner et al. - Immunometric Assay Interference - Incidence and Prevention; Clin Chem 48;4; 613-621, 2002
- L J Kricka - Interferences in Immunoassay - Still a Threat; Clin Chem 46, No. 8, 2000
- A. Dasgupta: Biotin and Other Interferences in Immunoassays – A Concise Guide. Elsevier, St. Louis, 2019
- Approved Guideline - Interference Testing in Clinical Chemistry, EP07 3rd Edition. April 2018. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Revision date : 2023-04-21

## APPENDIX

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

#### Interference

Plasma samples containing angiotensin I concentrations (low and high) were spiked with multiple concentrations of the substances listed below and assayed using Angiotensin I RIA KIT. Values were calculated as described in CLSI EP07, 3rd ed. [6]. Interference was determined by testing controls (no interfering substance added) and matched test samples (with interfering substance added). No interference (defined as a shift in dose > 15 %) was found for addition of interferent up to concentration stated in the table below.

Interferent	Test concentration
Biotin	1,631 NG/ML
Conjugated bilirubin	474.4 µG/ML
Hemoglobin	10,044 µG/ML
Triglycerides	15.20 MG/ML
Unconjugated bilirubin	384.3 µG/ML

In spite of hemoglobin, bilirubin (conjugated, unconjugated) and triglyceride interference data in the table, we advise to avoid using hemolyzed, lipemic or icteric samples.

#### Specificity

Analogue	Cross-reactivity (%)
Angiotensin I	100
Angiotensin II	ND
Angiotensin III	ND
Tetradecapeptide	ND
Angiotensinogen	ND

ND = Non-detectable

#### Precision Intra-assay

Sample	P1	P2
Number of determinations	25	25
Pra, ng/ml/hour	1.49	2.94
Cv (%)	11.25	11.25

#### Inter-assay

After generation of Angiotensin I, samples were determined in duplicates in 10 different series according to the procedure of the kit. Plasma renin activity was obtained and used for the calculation of inter-assay precision.

Sample	P1	P2	P3	P4	P5
Number of determinations	10	10	10	10	10
Pra, ng/ml/hour	0.69	3.37	7.08	15.09	24.15
Cv (%)	20.9	9.57	8.72	9.74	11.8

#### Accuracy

##### Dependence on time of enzymatic incubation

No dependence of PRA on time was observed.

Time, minutes		60	120	180
Pra Ng/ml/hour	Sample 1	0.30	0.32	0.33
	Sample 2	0.56	0.48	0.53
	Sample 3	1.04	1.15	1.19
	Sample 4	1.64	1.56	1.65
	Sample 5	5.12	5.19	4.93

#### Dilution test

Samples were diluted in zero calibrator and assayed according to the assay procedure of the kit.

Sample	Dilution Factor	Theoretical conc.	Observed conc.	Recovery (%)
		(NG/ML)		
P1	-	-	2.45	-
	1:2	1.23	1.21	98.78
	1:4	0.61	0.56	91.43
	1:8	0.31	0.27	88.16
P2	-	-	3.05	-
	1:2	1.53	1.46	95.74
	1:4	0.76	0.64	83.93
	1:8	0.38	0.34	89.18
P3	-	-	9.21	-
	1:2	4.61	4.30	93.38
	1:4	2.30	1.82	79.04
	1:8	1.15	0.90	78.18
	1:16	0.58	0.45	78.18

### Recovery test

Plasma samples were spiked with known quantities of angiotensin I and assayed according to the procedure of the kit.

Initial conc. (ng/ml)	Added angiotensin (ng/ml)	Observed conc. (ng/ml)	Observed addition (ng/ml)	Recovery (%)
0.88	1.01	1.89	2.09	110.7
	1.30	2.18	2.68	122.9
	1.93	2.81	3.20	113.9
1.39	1.01	2.40	2.64	110.2
	1.30	2.69	2.98	110.8
	1.93	3.32	3.59	108.2
1.54	1.01	2.54	2.84	111.7
	1.30	2.84	3.31	116.7
	1.93	3.46	4.03	116.4
2.60	1.01	3.61	3.83	106.2
	1.30	3.90	4.59	117.7
	1.93	4.53	5.20	114.9
2.62	1.01	3.62	3.75	103.5
	1.30	3.92	4.19	107.0
	1.93	4.55	4.82	106.0

### Expected data for children

Results are sorted according to age.

Children		Angiotensin (ng/ml/hr)				
Upright	N	Min	Max	Median	2.5 <sup>th</sup> percentile	97.5 <sup>th</sup> percentile
2-9 years	27	0.60	7.38	3.20	0.76	6.64
10-15 years	16	0.58	3.98	1.52	0.64	3.93

### <sup>125</sup>I Characteristics

T<sub>1/2</sub> (<sup>125</sup>I) = 1443 h = 60.14 d

<sup>125</sup> I	E (MeV)	%
γ	0.035	6.5
K <sub>α</sub> X-RAY	0.027	112.5
K <sub>β</sub> X-RAY	0.031	25.4