

Plasma Renin Activity Elisa Kit

KAPDB4600



History

Summary of change :

Previous Version : 230629	Current Version : 250624																																
Old pictogram	Revised pictogram																																
7. <table><tr><td>BUF</td><td>Generation Buffer</td></tr><tr><td>Contents:</td><td>One bottle containing a buffer and a non-toxic antibiotic.</td></tr><tr><td>Format:</td><td>Ready to Use</td></tr><tr><td>Volume:</td><td>5 mL/bottle</td></tr><tr><td>Storage:</td><td>2–8°C</td></tr><tr><td>Stability:</td><td>Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.</td></tr><tr><td>Safety</td><td>Refer to product SDS.</td></tr><tr><td colspan="2"> Warning</td></tr></table>	BUF	Generation Buffer	Contents:	One bottle containing a buffer and a non-toxic antibiotic.	Format:	Ready to Use	Volume:	5 mL/bottle	Storage:	2–8°C	Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.	Safety	Refer to product SDS.	 Warning		7. <table><tr><td>BUF</td><td>Generation Buffer</td></tr><tr><td>Contents:</td><td>One bottle containing a buffer and a non-toxic antibiotic.</td></tr><tr><td>Format:</td><td>Ready to Use</td></tr><tr><td>Volume:</td><td>5 mL/bottle</td></tr><tr><td>Storage:</td><td>2–8°C</td></tr><tr><td>Stability:</td><td>Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.</td></tr><tr><td>Safety</td><td>Refer to product SDS.</td></tr><tr><td colspan="2"> Danger</td></tr></table>	BUF	Generation Buffer	Contents:	One bottle containing a buffer and a non-toxic antibiotic.	Format:	Ready to Use	Volume:	5 mL/bottle	Storage:	2–8°C	Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.	Safety	Refer to product SDS.	 Danger	
BUF	Generation Buffer																																
Contents:	One bottle containing a buffer and a non-toxic antibiotic.																																
Format:	Ready to Use																																
Volume:	5 mL/bottle																																
Storage:	2–8°C																																
Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.																																
Safety	Refer to product SDS.																																
 Warning																																	
BUF	Generation Buffer																																
Contents:	One bottle containing a buffer and a non-toxic antibiotic.																																
Format:	Ready to Use																																
Volume:	5 mL/bottle																																
Storage:	2–8°C																																
Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.																																
Safety	Refer to product SDS.																																
 Danger																																	



Plasma Renin Activity Elisa Kit

en

For the quantitative determination of Plasma Renin Activity (PRA) in human plasma by enzyme immunoassay.

KAPDB4600

IN VITRO DIAGNOSTIC

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

INTENDED USE

For the quantitative measurement Plasma Renin Activity (PRA) in human EDTA plasma by an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

This kit is intended for professional use only and is for laboratory use only. For in vitro diagnostic use only. Intended to be used manually but may be adaptable to open automated analyzers. The user is responsible for validating the performance of this kit with any automated analyzers.

PRINCIPLE OF THE TEST

Prior to testing plasma samples with the PRA ELISA, a specimen pre-treatment step is required. First, a protease inhibitor (PMSF) is added to the sample to prevent the degradation of angiotensin-I. Next, the generation buffer is added to bring the pH of the sample to approximately 6.0. The plasma sample is then pipetted into two aliquots. One aliquot is incubated at 0°C (ice bath) and the other is incubated at 37°C. Angiotensin-I will be generated by plasma renin in the fraction incubated at 37°C.

The PRA ELISA is a competitive immunoassay. In the first incubation step, competition occurs between angiotensin-I present in calibrators, controls, specimen samples and an angiotensin-I-biotin conjugate (biotin conjugate) for a limited number of anti-angiotensin-I antibody binding sites on the microplate wells. During this incubation, protease inhibitors are present to prevent the degradation of angiotensin-I into smaller peptides.

In the second incubation step, streptavidin-HRP conjugate is added, which binds specifically to any bound biotin conjugate. Unbound streptavidin HRP conjugate is removed by a washing step. Next, the TMB substrate (enzyme substrate) is added which reacts with HRP to form a blue coloured product that is inversely proportional to the amount of angiotensin-I present. The enzymatic reaction is terminated by the addition of the stopping solution, converting the blue colour to a yellow colour. The absorbance is measured on a microplate reader at 450 nm. A set of calibrators is used to plot a calibrator curve from which the concentration of angiotensin-I in specimen samples and controls can be directly read.

The plasma renin activity concentration in the plasma sample is calculated from the angiotensin-I concentration in the 0°C and 37°C aliquots and the generation time used. The plasma renin activity results are expressed in terms of the mass of angiotensin-I generated per volume of human plasma per unit of time (ng/mL/h).

CLINICAL APPLICATIONS

Plasma renin activity is an important diagnostic test for individualized therapy for resistant hypertension. It has been reported that measuring plasma renin activity significantly improved blood pressure control in patients with severe resistant hypertension [1]. A randomized trial in the USA reported a reduction of medication required to achieve control using plasma renin activity to guide therapy [2].

PRA is based on renin releasing angiotensin-I from angiotensinogen. Angiotensin-I is transformed to angiotensin-II largely in pulmonary circulation by the angiotensin-converting enzyme (ACE). Angiotensin-II raises blood pressure by direct arteriolar vasoconstriction, promoting sodium retention, and stimulating the secretion of aldosterone from the adrenal cortex. Aldosterone also exerts an effect to restore sodium balance and lift arterial pressure. Hence, the determination of plasma renin activity can aid in the diagnosis of primary hyperaldosteronism (5–13% of hypertensive cases) and assist in the therapy and management of other forms of hypertension.

PRA and renin concentration assays provide different information about plasma renin. First, PRA is the expression of the rate of angiotensin-I formation through the enzymatic action of renin on its substrate, angiotensinogen. Therefore, PRA depends not only on renin concentration but also on the concentration of angiotensinogen which is overlooked in the renin concentration assays. Second, plasma renin concentration

assays do not ensure sensitivity in low renin states, while the sensitivity of the PRA assay can be enhanced by increasing the incubation time during the generation step. Third, PRA is influenced by inhibitors, whereas the presence of inhibitors does not affect the recognition of renin by currently available immunoassays, therefore total renin concentration does not always correlate with plasma renin activity. Those differences should be understood by clinicians and clinical chemists for the correct interpretation of the assays [17].

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. This kit is for use by trained laboratory personnel (professional use only). For laboratory in vitro use only.

2. Practice good laboratory practices when handling kit reagents and specimens. This includes:

- Do not pipette by mouth.
- Do not smoke, drink, or eat in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear protective clothing and disposable gloves.
- Wash hands thoroughly after performing the test.
- Avoid contact with eyes; use safety glasses; in case of contact with eyes, flush eyes with water immediately and contact a doctor.

3. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.

4. Do not use the kit beyond the expiry date stated on the label.

5. If the kit reagents are visibly damaged, do not use the test kit.

6. Do not use kit components from different kit lots within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.

7. All kit reagents and specimens must be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of specimens.

8. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.

9. Immediately after use, each individual component of the kit must be returned to the recommended storage temperature stated on the label.

10. A calibrator curve must be established for every run.

11. It is recommended to all customers to prepare their own control materials or plasma pools which should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.

12. The controls (included in kit) must be included in every run and their results must fall within the ranges stated in the quality control certificate; a failed control result might indicate improper procedural techniques or pipetting, incomplete washing, or improper reagent storage.

13. When dispensing the substrate and stopping solutions, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.

14. The TMB Substrate is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.

15. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored plasma.

16. Collected specimen samples must be immediately processed (centrifuged) and the plasma must be either stored frozen or kept at room temperature for immediate use. Samples should not be chilled on ice or stored at temperatures between 0-10°C during collection or processing as this could lead to overestimation of renin activity.

17. Samples or controls containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, they may lead to false results.

18. If sample values are above the angiotensin-I measuring range of the ELISA kit, they may be further diluted and retested. Only calibrator 0 may be used to dilute

plasma samples. The use of any other reagent may lead to false results. Samples must be diluted only after they have undergone the angiotensin-I generation procedure.

19. Avoid microbial contamination of reagents.
20. To prevent the contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, calibrator, and control.
21. To prevent the contamination of reagents, do not pour reagents back into the original containers.
22. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to local and/or national regulations.
23. Consumables used with the kit that are potentially biohazardous (e.g., pipette tips, bottles or containers containing human materials) must be handled according to biosafety practices to minimize the risk of infection and disposed of according to local and/or national regulations relating to biohazardous waste.
24. This kit contains 1 M sulfuric acid in the stopping solution component. Do not combine acid with waste material containing sodium azide or sodium hypochlorite.
25. The use of safety glasses, and disposable plastic, is strongly recommended when manipulating biohazardous or bio-contaminated solutions.
26. Proper calibration of the equipment used with the test, such as the pipettes and absorbance microplate reader, is required.
27. If a microplate shaker is required for the assay procedure, the type and speed of shaker required is stated in the REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED section. Both the type and speed of shaker used can influence the optical densities and test results. If a different type of shaker and/or speed is used, the user is responsible for validating the performance of the kit.
28. Do not reuse the microplate wells, they are for SINGLE USE only.
29. To avoid condensation within the microplate wells in humid environments, do not open the pouch containing the microplate until it has reached room temperature.
30. Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

LIMITATIONS

1. This test is not intended to be used for screening purposes.
2. This test is not intended for home testing or self-testing.
3. The kit is calibrated for the determination of renin activity in human plasma. The kit is not calibrated for the determination of renin activity in other specimens of human or animal origin.
4. The results obtained with this kit shall never be used as the sole basis for a clinical diagnosis and for therapeutic decisions.
5. Although common interfering substances have been evaluated with this test, other substances that have not been evaluated such as drugs and the occurrence of heterophilic antibodies in individuals regularly exposed to animals or animal products have the potential of causing interferences.
6. The angiotensin-I level depends on multiple factors, including renin activity, renin substrate concentration, plasma pH, temperature, and selection of inhibitors. Therefore, only carefully prepared plasma samples are suitable for this test. Bacterial contaminations, repeated freeze and thaw cycles and dilution of plasma samples may affect the assay result.
7. The interpretation of the results should recognize that some conditions can affect renin secretion, such as sodium and potassium intake, posture, medications like diuretics, clonidine, beta-blockers, and peripheral vasodilators.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions applied to blood specimens. All human specimens should be considered a potential biohazard and handled as if capable of transmitting infections and in accordance with good laboratory practices.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid direct contact with any of the kit reagents. Specifically avoid contact with the TMB Substrate (contains tetramethylbenzidine), Stopping Solution (contains sulfuric acid) and PMSF. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water and refer to SDS for additional information.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated single-channel pipette to dispense 5 µL, 50 µL, 250 µL and 500 µL.
2. Calibrated multi-channel pipettes to dispense 50 µL, 100 µL and 150 µL.
3. Calibrated multi-channel pipettes to dispense 300 µL (if washing manually).
4. Automatic microplate washer (recommended).
5. Microplate shaker:
 - a. Orbital shaker (3 mm diameter) set to 600 rpm or
 - b. Reciprocating shaker (1.5" stroke length) set to 180 oscillations/minute.
6. Disposable pipette tips.
7. Distilled or deionized water.
8. Calibrated absorbance microplate reader with a 450 nm filter and an upper OD limit of 3.0 or greater.
9. Polypropylene tubes for sample processing and pre-treatment (e.g., polypropylene microcentrifuge tubes).
10. A 37°C incubator.
11. A 0-4°C ice bath.
12. Ethanol (94% or higher concentration).
13. Water bath.

REAGENTS PROVIDED

1. Microplate

Contents:	Two anti-angiotensin-I polyclonal antibody-coated 96-well (12x8) microplates, each in a resealable pouch with desiccant.
Format:	Ready to Use
Storage:	2-8°C
Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.

2. Biotin Conjugate

Contents:	One bottle containing Angiotensin-I-Biotin conjugate in a protein-based buffer with protease inhibitors and a non-mercury preservative.
Format:	Ready to Use
Volume:	30 mL/bottle
Storage:	2-8°C
Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.

3. Streptavidin-HRP Conjugate Concentrate

Contents:	One bottle containing Streptavidin-Horse Radish Peroxidase (HRP) conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
Format:	Concentrated; Requires Preparation
Volume:	0.5 mL/bottle
Storage:	2-8°C
Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks. Following Preparation: The HRP conjugate working solution is stable for 8 hours at room temperature following preparation.
Preparation of Streptavidin-HRP Conjugate Working Solution:	X100 Dilute 1:100 Before Use Dilute 1:100 in assay buffer before use (e.g., 20 µL of conjugate concentrate in 1.98 mL of assay buffer). If one whole microplate is to be used, dilute 200 µL of conjugate concentrate in 19.8 mL of assay buffer. Discard any that is left over.

4. Calibrators 0-7

Contents:	Eight bottles of calibrator containing specified angiotensin-I concentrations. Protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with defined quantities of angiotensin-I. The calibrators are calibrated against the World Health Organization reference reagent NIBSC code 86/536. Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations.
-----------	--

Concentrations:	0, 0.2, 0.5, 1.5, 4, 10, 25, 60 ng/mL.
Format:	Ready to Use
Volume:	Calibrator 0: 2.0 mL/bottle Calibrator 1-7: 1.0 mL/bottle
Storage:	2–8°C
Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.

5. **CONTROL** **N** **Controls**

Contents:	Two bottles of control containing different angiotensin-I concentrations. Protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with defined quantities of angiotensin-I. Refer to the QC certificate for the target values and acceptable ranges.
Format:	Ready to Use
Volume:	1.0 mL/bottle
Storage:	2–8°C
Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.

6. **ASS** **BUF** **Assay Buffer**

Contents:	One bottle containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
Format:	Ready to Use
Volume:	40 mL/bottle
Storage:	2–8°C
Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.

7. **BUF** **Generation Buffer**

Contents:	One bottle containing a buffer and a non-toxic antibiotic.
Format:	Ready to Use
Volume:	5 mL/bottle
Storage:	2–8°C
Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.
Safety	Refer to product SDS.  Danger

8. **PMSF** **PMSF solution – Requires Preparation**

Contents:	Two tubes containing phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF).
Format:	Requires Preparation
Quantity:	2 x tubes
Storage:	2–8°C
Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. Following Preparation: Stable for 2 months at 2–8°C.
Preparation of PMSF Working Solution:	Reconstitute by adding 0.5 mL of ethanol (94% or higher concentration) to the tube. Cap the tube and vortex for two minutes to completely dissolve.
Solution:	Refrigerate after first use, vortex again to re-dissolve contents before use. Do not keep the bottle open unnecessarily.
Safety:	  Refer to product SDS. Danger

9. **CHROM** **TMB** **TMB Substrate**

Contents:	One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.
Format:	Ready to Use
Volume:	32 mL/bottle
Storage:	2–8°C
Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.

10. **STOP** **SOLN** **Stopping Solution**

Contents:	One bottle containing 1M sulfuric acid.
Format:	Ready to Use
Volume:	12 mL/bottle
Storage:	2–8°C
Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks.
Safety:	 Refer to product SDS. Warning

11. **WASH** **SOLN** **CONC** **Wash Buffer Concentrate – Requires Preparation**

Contents:	Two bottles containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.
Format:	Concentrated; Requires Preparation
Volume:	50 mL/bottle (Quantity: 2 bottles)
Storage:	2–8°C
Stability:	Unopened: Stable until the expiry date printed on the label. After Opening: Stable for ten weeks. Following Preparation: The wash buffer working solution is stable for 2 weeks following preparation, assuming Good Laboratory Practices are adhered to. To prevent microbial growth, prepare the wash buffer working solution in a clean container and store under refrigerated conditions (2–8°C) when not in use.
Preparation of Wash Buffer Working Solution:	X10 Dilute 1:10 Before Use Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If one whole microplate is to be used, dilute 50 mL of the wash buffer concentrate in 450 mL of distilled or deionized water.

SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND PRE-TREATMENT

1. Specimen Collection & Storage

A minimum of 0.5 mL of EDTA plasma is required per duplicate determination. Proper sample collection is essential for the accurate determination of angiotensin-I. The in vitro generation and degradation of angiotensin-I can be minimized by following the recommended collection and processing procedure as stated below.

1. Collect at least 2 mL of venous blood into an appropriately labelled EDTA blood collection tube.
 2. Centrifuge the sample at room temperature for 15 minutes at 2000 g.
 3. Transfer the plasma sample into a new labelled storage tube.
 4. If samples are to be assayed immediately, proceed to the Specimen Pre-Treatment section, otherwise store at room temperature for up to 6 hours or freeze at -20°C or lower for up to 30 days. Avoid more than two freeze-thaw cycles.
- Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

2. Specimen Pre-Treatment & Storage

Prior to being tested, all processed plasma specimens must be pre-treated according to the Angiotensin-I generation procedure as stated below. At the end of this procedure, there will be two pre-treated aliquots per plasma sample, a 0°C aliquot and a 37°C aliquot.

ANGIOTENSIN-I GENERATION PROCEDURE

1. If a freshly processed plasma sample is being used, proceed to step 2. If a frozen plasma sample is being used, thaw the sample quickly by placing the tube in a room temperature water bath.
2. Pipette 0.5 mL of the plasma sample into a new sample tube.
3. Pipette 5 µL of the PMSF solution (see section Reagents Provided, 8. PMSF, for preparation instructions) into the tube containing the plasma sample from step 2 (1:100 ratio). Vortex the tube to mix thoroughly.
4. Pipette 50 µL of the generation buffer into the tube containing the treated sample from step 3 (1:10 ratio). Vortex the tube to mix thoroughly.
5. Pipette 0.25 mL of the sample from step 4 into a new sample tube. There will now be two aliquots of the treated plasma sample. Label one as 0°C and the other as 37°C.
6. Simultaneously place the 37°C labelled tube into a 37°C incubator and place the 0°C labelled tube into an ice bath (0-4°C) for 90 minutes or longer (do not exceed 180 minutes). Be sure to record the incubation time used, as this is required to calculate the plasma renin activity.
7. At the end of the incubation period place the 37°C tube in the ice bath for 5 minutes to cool it down quickly.
8. If the generated samples will be tested immediately, bring both sample tubes (0°C and 37°C) to room temperature by placing them in a water bath with room temperature water for 5–10 minutes. The samples are now ready for testing.
9. If the generated samples will be tested at a later time, immediately freeze both sample tubes (0°C and 37°C) at -20°C or lower for up to 3 months. Prior to use, bring the frozen generated samples to room temperature by placing them in a water bath with room temperature water for 5-10 minutes. The samples are now ready for testing.

ASSAY PROCEDURE

Specimen Pre-Treatment:



All specimens that will be tested must be pre-treated before being tested (see section Specimen Pre-Treatment & Storage). Do not pre-treat the calibrators and kit controls as they are provided ready to use.

All kit components, controls and specimen samples must reach room temperature prior to use. Calibrators, controls, and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1. After all kit components have reached room temperature, mix gently by inversion.
2. Prepare the Streptavidin-HRP Conjugate Working Solution and Wash Buffer Working Solution (See section Reagents Provided section, 3. Streptavidin-HRP Conjugate Concentrate and 11. Wash Buffer Concentrate).
3. Prepare all specimen samples that will be tested. Refer to section Specimen Pre-Treatment & Storage. For each plasma sample, both the 0°C and 37°C pre-treated samples must be run together within the same test.
4. Plan the microplate wells to be used for calibrators, controls, and samples. See section Recommended Assay Layout.
Remove the strips from the microplate frame that will not be used and place them in the bag with desiccant. Reseal the bag with the unused strips and return it to the refrigerator.
5. Pipette 50 µL of each calibrator, control, and pre-treated specimen sample (both 0°C and 37°C aliquots) into assigned wells.
6. Pipette 100 µL of the Biotin Conjugate into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended).
7. Incubate the microplate on a microplate shaker** for 60 minutes at room temperature.
8. Wash the microplate wells with an automatic microplate washer (preferred) or manually as stated below.

Automatic: Using an automatic microplate washer, perform a 5-cycle wash using 300 µL/well of Wash Buffer Working Solution (5 x 300 µL). One cycle consists of aspirating all wells then filling each well with 300 µL of Wash Buffer Working Solution. After the final wash cycle, aspirate all wells and then tap the microplate firmly against absorbent paper to remove any residual liquid.

Manually: For manual washing, perform a 5-cycle wash using 300 µL/well of

Wash Buffer Working Solution (5 x 300 µL).

One cycle consists of aspirating all wells by briskly emptying the contents of the wells over a waste container, then pipetting 300 µL of Wash Buffer Working Solution into each well using a multi-channel pipette. After the final wash cycle, aspirate all wells by briskly emptying the contents over a waste container and then tap the microplate firmly against absorbent paper to remove any residual liquid.

9. Pipette 150 µL of the Streptavidin-HRP Conjugate Working Solution into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended).
10. Incubate the microplate on a microplate shaker** for 30 minutes at room temperature.
11. Wash the microplate wells again as stated in step 8.
12. Pipette 150 µL of TMB Substrate into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended).
13. Incubate the microplate on a microplate shaker** for 15 minutes at room temperature.
14. Pipette 50 µL of Stopping Solution into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended) in the same order and speed as was used for addition of the TMB Substrate. Gently tap the microplate frame to mix the contents of the wells.
15. Measure the optical density (absorbance) in the microplate wells using an absorbance microplate reader set to 450 nm, within 20 minutes after addition of the Stopping Solution.

** See section Reagents And Equipment Needed But Not Provided for microplate shaker options.

CALCULATIONS

- 1- Calculate the mean optical density for each calibrator, control and specimen sample duplicate.
- 2- Use a 4-parameter or 5-parameter curve fit with immunoassay software to generate a calibrator curve.
- 3- The immunoassay software will calculate the concentrations of the controls and specimen samples using the mean optical density values and the calibrator curve.
- 4- Using the obtained concentrations of Angiotensin-I (Ang-I) in the 37°C and 0°C aliquots and the generation time used, calculate the plasma renin activity (PRA) in each sample using the following equation:

$$PRA = \left(\frac{[Ang-I (37^{\circ}C)] - [Ang-I (0^{\circ}C)]}{Generation Time (h)} \right) \times 1.11$$

- 5- If a sample reads more than 60 ng/mL then dilute the sample (that has undergone the angiotensin-I generation procedure) with calibrator 0 at a dilution of no more than 1:10 and rerun the sample. The result obtained must be multiplied by the dilution factor.

Note: Samples must be diluted only after they have undergone the angiotensin-I generation procedure; do not dilute any samples before performing the angiotensin-I generation procedure.

QUALITY CONTROL

When assessing the validity of the test results, the following criteria should be evaluated:

1. The calibrator 0 mean optical density meets the acceptable range as stated in the QC Certificate.
2. The calibrator with the highest concentration meets the % binding acceptable range as stated in the QC Certificate. % Binding = (OD of calibrator/OD of calibrator 0) x 100.
3. The values obtained for the kit controls are within the acceptable ranges as stated in the QC certificate.
4. The results of any external controls that were used meet the acceptable ranges.

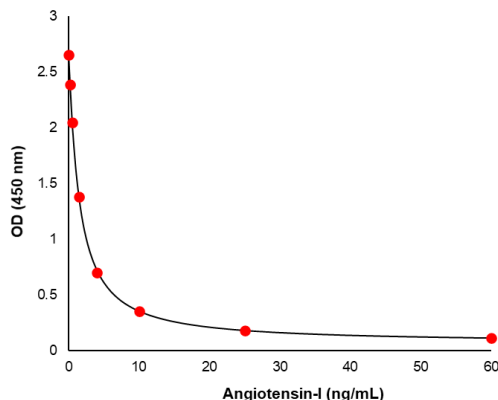
TYPICAL TABULATED DATA

Sample data only. Do not use to calculate results

Calibrator	Mean OD (450 nm)	% Binding	Angiotensin-I (ng/mL)
0	2.654	100	0
1	2.388	90	0.2
2	2.044	77	0.5
3	1.383	52	1.5
4	0.701	26	4
5	0.353	13	10
6	0.182	7	25
7	0.114	4	60
Unknown	1.634	-	1.0

TYPICAL CALIBRATION CURVE

Sample curve only, do not use to calculate results.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The analytical sensitivity study was performed according to the CLSI EP17-A2 guideline. The Limit of Background (LoB), Limit of Detection (LoD) and Limit of Quantitation (LoQ) for both Angiotensin-I and PRA are summarized in the table below:

Parameter	Angiotensin-I (ng/mL)	PRA (ng/mL/h)
LoB	0.093	0.024
LoD	0.166	0.059
LoQ	0.166	0.090

SPECIFICITY (CROSS-REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity using the Abraham method with angiotensin-I cross reacting at 100%:

Compound	% Cross-Reactivity
Angiotensin I	100%
Angiotensin II	< 0.001%
Angiotensin III	< 0.001%
Angiotensin 1-5	< 0.001%
Angiotensin 1-7	< 0.001%
Angiotensin 1-9	0.122%
Renin Substrate	0.015%

RECOVERY

Spiked samples were prepared by adding defined amounts of angiotensin-I to three patient plasma samples. The results (in ng/mL) are tabulated below:

Sample	Observed Result	Expected Result	Recovery %
1 Unspiked	1.09	-	-
+ 1	2.16	2.09	103.3
+ 15	15.3	16.1	95.0
+ 50	41.8	51.1	81.8
2 Unspiked	1.72	-	-
+ 1	2.70	2.72	99.3
+ 15	16.8	16.7	100.6
+ 50	54.1	51.7	104.6
3 Unspiked	1.01	-	-
+ 1	1.76	2.01	87.6
+ 15	12.7	16.0	79.4
+ 50	41.7	51.0	81.8

LINEARITY

The linearity study was according to the CLSI EP06-Ed2 guideline using three human EDTA plasma samples.

Each plasma sample was pre-treated according to the Angiotensin-I Generation Procedure to produce a 0°C and 37°C aliquot. Each aliquot was diluted using calibrator 0 at several equidistant concentration levels and up to a 1:10 dilution. Samples were tested in quadruplicate, and the results compared to the predicted concentrations. The statistical analysis shows that the assay is sufficiently linear up to a 1:10 dilution when using calibrator 0 as the diluent. The results (in ng/mL/h) are tabulated below:

Sample	Observed Result	Expected Result	Recovery %
1	33.7	-	-
1:2	17.9	16.9	105.9
1:4	8.33	8.43	98.8
1:10	3.24	3.37	96.1
2	7.11	-	-
1:2	3.33	3.56	93.5
1:4	1.59	1.78	89.3
1:10	0.60	0.71	84.5
3	1.66	-	-
1:2	0.68	0.83	81.9
1:4	0.33	0.42	78.6
1:10	0.13	0.17	76.5

INTERFERENCE

An interference study was performed according to the CLSI EP07-Ed3 guideline. Three human plasma samples were spiked with potentially interfering substances. No significant interference was detected up to the concentrations shown in the table below.

Interferent	Test Concentration
Acetaminophen	30 µg/mL
Acetylcysteine	15 mg/dL
Acetylsalicylic Acid	3 mg/dL
Ampicillin Na	7.5 mg/dL
Bilirubin Conjugated	20 mg/dL
Bilirubin Unconjugated	40 mg/dL
Biotin	2.4 µg/mL
Captopril	1000 ng/mL
Captopril disulfide	10 µg/mL
Cathepsin B	100 ng/mL
Cathepsin D	10 ng/mL
Cefoxitin Na	300 mg/dL
Cyclosporine	0.18 mg/dL
Doxycycline HCl	1.8 mg/dL
Enalaprilat dihydrate	200 ng/mL
Furosemide (Lasix)	50 µg/mL
Haemoglobin	1.25 g/L
HAMA	1000 ng/mL

Heparin	3300 U/L
Human Serum Albumin	52 g/L
Ibuprofen	21.9 mg/dL
Insulin	150 µU/mL
Levodopa	0.75 mg/dL
Methyldopa	2.25 mg/dL
Metronidazole	12.3 mg/dL
Nicardipine (Loxen)	200 ng/mL
Phenylbutazone	32.1 mg/dL
Rheumatoid Factor (RF)	200 IU/mL
Rifampicin	4.8 mg/dL
Theophylline	25 µg/mL
Triglycerides	1000 mg/dL

PRECISION

The precision studies were performed according to the CLSI EP05-A3 guideline.

REPEATABILITY

Five EDTA plasma samples covering the range of the assay (from 0.17 to 52.1 ng/mL of angiotensin-I) were run by one operator with one kit lot over 20 days, two runs per day and two replicate measurements per run, producing a total of 80 measurements per sample (20x2x2 design for each sample). The position of the samples in the microplate was randomly changed from one day to another. The PRA generation times spanned 90-180 minutes. Data were analyzed with a two-way nested ANOVA and are summarized in the table below

Sample	Mean, PRA, ng/mL/hr	Repeatability		Within Laboratory	
		SD, PRA, ng/mL/hr	CV	SD, PRA, ng/mL/hr	CV
1	0.322	0.0367	11.4%	0.0615	19.1%
2	4.568	0.2060	4.5%	0.3565	7.8%
3	1.672	0.0768	4.6%	0.1275	7.6%
4	7.924	0.5005	6.3%	0.8042	10.1%
5	22.886	1.7496	7.6%	3.0223	13.2%

REPRODUCIBILITY

Reproducibility was evaluated across three locations using an experimental design model 3x5x5 (3 locations x 5 testing days x 5 replicates per sample per day). The study included five plasma samples covering the kit assay range and the two kit controls. The generation time changed from day to day covering the full range suggested in this IFU (90-180 minutes). The position of the kit controls and samples in the microplate was randomized from one day to another. Data was analyzed with a two-way nested ANOVA and are summarized in the table below.

Kit Controls	Mean	Repeatability		Within Location		Reproducibility	
	ng/mL	SD, ng/mL	CV%	SD, ng/mL	CV%	SD, ng/mL	CV%
1	0.966	0.051	5.2	0.081	8.4	0.140	14.5
2	9.850	0.370	3.8	0.701	7.1	0.820	8.3
PRA	ng/mL/h	SD, ng/mL/h	CV%	SD, ng/mL/h	CV%	SD, ng/mL/h	CV%
S1	0.285	0.049	17.2	0.053	18.7	0.065	22.9
S2	4.416	0.247	5.6	0.596	13.5	0.596	13.5
S3	1.431	0.101	7.1	0.147	10.3	0.256	17.9
S4	7.656	0.490	6.4	0.827	10.8	0.910	11.9
S5	22.763	2.379	10.5	3.520	15.5	3.985	17.5

EXPECTED NORMAL VALUES

As for all clinical assays, each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.

Data from Literature reference [18].

N	PRA Mean (ng/mL/h)	PRA Range (10 th -90 th percentile) (ng/mL/h)
533	0.75	0.06 - 4.69

REFERENCES

- Spence JD. (1999) Physiologic tailoring of therapy for resistant hypertension: 20 years' experience with stimulated renin profiling. *Am J Hypertension*. 12(11 Pt 1):1077-83.
- Egan BM, Basile JN, Rehman SU, Davis PB, Grob CH, III, Riehle JF, et al. (2009) Plasma Renin test-guided drug treatment algorithm for correcting patients with treated but uncontrolled hypertension: a randomized controlled trial. *Am J Hypertens*. 22(7):792-801.
- Tan ACITL, Kloppenborg PWC, Benraad TJ. (1989) Influence of Age, Posture and Intra-Individual Variation on Plasma Levels of Atrial Natriuretic Peptide. *Annals of Clinical Biochemistry*. 26(6):481-486.
- Tiu, S. C., Choi, C. H., Shek, C. C., Ng, Y. W., Chan, F. K., Ng, C. M., & Kong, A. P. (2005). The use of aldosterone-renin ratio as a diagnostic test for primary hyperaldosteronism and its test characteristics under different conditions of blood sampling. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(1), 72-78..
- Sealey JE, Gerten-Banes J, Laragh JH (1972), The renin system: Variations in man measured by radioimmunoassay or bioassay *Kidney International* 1:240-253.
- Sealey, J. E., Gordon, R. D., & Mantero, F. (2005). Plasma renin and aldosterone measurements in low renin hypertensive states. *Trends in endocrinology and metabolism*. TEM, 16(3), 86-91.
- J. Brossaud and J.B. Corcuff, (2009) Pre-analytical and Analytical Considerations for the Determination of Plasma Renin Activity, *Clinica Chimica Acta* 410:90-92.
- F. K. Suessenbach, B. B. Burckhardt. Levels of angiotensin peptides in healthy and cardiovascular/ renal - diseased paediatric population—an investigative review. *Heart Failure Reviews* (2019) 24:709-723
- <https://doi.org/10.1007/s10741-019-09797-y>
- Guoqing Yao, Wenjing Li, Wenzhao Liu, et al. (2021) The Level and Significance of Circulating Angiotensin-III in Patients with Coronary Atherosclerosis. *Hindawi Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 1704762, <https://doi.org/10.1155/2021/1704762>
- Valle Martins AL, da Silva FA, Bolais-Ramos L, et al. (2021) Increased circulating levels of angiotensin-(1-7) in severely ill COVID-19 patients. *ERJ Open Res* 7: 00114-2021 [DOI: 10.1183/23120541.00114-2021].
- Clare A. McKinney, Caroline FATTAH, Christopher M. Loughrey et al. (2014) Angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9): function in cardiac and vascular remodelling. *Clinical Science*. 126, 815-827 (Printed in Great Britain) doi: 10.1042/CS20130436
- Stirati G, de Martino A, Mene P, et al. (1983) Plasma renin activity: effect of temperature during blood processing. *J Clin Chem Clin Biochem* 529-31
- Ruth Lapworth, Sally E Green and Frances Short. (1990) In vitro stability of assayed renin activity in plasma and whole blood. *Ann Clin Biochem* 27: 78-79
- Zoltan Locsei, Karoly Racz, Attila Patocs et al. (2009). Influence of sampling and storage conditions on plasma renin activity and plasma renin concentration. *Clinica Chimica Acta* 402 203-205
- Morganti, A; Lonati, C; Turolo, L (2010) Brief Cryoactivation Markedly Affects Plasma Renin Activity and Direct Renin Measurement in Low Renin Samples: PP.24.473, *Journal of Hypertension*: 28 p e388 doi: 10.1097/01.hjh.0000379399.50039.3c.
- Sealey JE. (1991) Plasma renin activity and plasma prorenin assays. *Clin Chem*. 37(10 Pt 2):1811-9. PMID: 1914195.
- Campbell, D. J., Nussberger, J., Stowasser, M., Danser, A. H., Morganti, A., Frandsen, E., & Ménard, J. (2009). Activity assays and immunoassays for plasma Renin and prorenin: information provided and precautions necessary for accurate measurement. *Clinical chemistry*, 55(5), 867-877.
- Brossaud J, Corcuff JB. Pre-Analytical and Analytical Considerations for the Determination of Plasma Renin Activity. *Clin Chim Acta*. 2009; 410(1-2):90-2.



Kit Plasma Renin Activity Elisa

es

Para la determinación cuantitativa de la Actividad de la Renina Plasmática (ARP) en plasma humano por inmunoensayo enzimático.

KAPDB4600

DIAGNÓSTICO IN VITRO

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

INDICACIONES

Para la medición cuantitativa de la Actividad de la Renina Plasmática (ARP) en plasma humano con EDTA mediante ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).

Este kit es solo para uso profesional y solo para uso en laboratorio. Solo para uso diagnóstico *in vitro*. Diseñado para usarse de forma manual, pero puede adaptarse a analizadores abiertos y automatizados. El usuario es responsable de validar el rendimiento de este kit con cualquier analizador automatizado.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Antes de analizar las muestras de plasma con PRA ELISA, es necesario realizar un paso de pretratamiento de la muestra. Primero, se añade un inhibidor de la proteasa (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF) a la muestra para evitar la degradación de la angiotensina-I. A continuación, se añade el tampón de generación para ajustar el pH de la muestra a aproximadamente 6,0. A continuación, la muestra de plasma se pipetea en dos alícuotas. Una alícuota se incuba a 0 °C (en baño de hielo) y la otra se incuba a 37 °C. La renina plasmática generará angiotensina-I en la fracción incubada a 37°C. El PRA ELISA es un inmunoensayo competitivo. En el primer paso de incubación, la competición se produce entre la angiotensina-I presente en los calibradores, los controles, las muestras y un conjugado con angiotensina-I-biotina (conjugado con biotina) por un número limitado de sitios de unión de los anticuerpos anti-angiotensina-I en los pocillos de la microplaca. Durante esta incubación, para evitar la degradación de la angiotensina-I en péptidos más pequeños, estarán presentes los inhibidores de la proteasa.

En el segundo paso de incubación, se añade el conjugado con estreptavidina-HRP, que se une específicamente a cualquier conjugado con biotina unido. El conjugado con estreptavidina HRP no unido se elimina mediante un paso de lavado. A continuación, se añade el sustrato TMB (sustrato enzimático) que reacciona con la HRP para formar un producto de color azul que es inversamente proporcional a la cantidad de angiotensina-I presente. La reacción enzimática se detiene añadiendo solución de parada, lo que modifica el color azul en color amarillo. Un lector de placas de microvaloración medirá la absorbancia a 450 nm. Se utiliza un conjunto de calibradores para trazar una curva de calibración en la que poder leer directamente la concentración de angiotensina-I en las muestras y en los controles.

La concentración de la actividad de la renina plasmática en la muestra de plasma se calcula a partir de la concentración de angiotensina-I en las alícuotas a 0 °C y a 37 °C y el tiempo de generación utilizado. Los resultados de la actividad de la renina plasmática se expresan en términos de masa de angiotensina-I generada por volumen de plasma humano y por unidad de tiempo (ng/mL/h).

APLICACIONES CLÍNICAS

La actividad de la renina plasmática es una prueba diagnóstica importante para el tratamiento individualizado de la hipertensión arterial resistente. Se ha notificado que la medición de la actividad de la renina plasmática mejoró notablemente el control de la presión arterial en pacientes con hipertensión arterial resistente grave [1]. Un ensayo aleatorizado realizado en los EE. UU. indicó que se produjo una reducción de la medicación necesaria para lograr el control utilizando la actividad de la renina plasmática para guiar el tratamiento [2].

La ARP está basada en la capacidad de la renina para producir angiotensina I a partir de angiotensinógeno. La angiotensina-I se transforma en angiotensina-II sobre todo en la circulación pulmonar gracias la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La angiotensina-II eleva la presión arterial mediante vasoconstricción arteriolar directa, fomentando la retención de sodio y estimulando la secreción de aldosterona de la corteza suprarrenal. La aldosterona también ejerce un efecto para restaurar el equilibrio de sodio y elevar la presión arterial. Por lo tanto, la determinación de la actividad de la renina plasmática puede ayudar en el diagnóstico de hiperaldosteronismo primario (del

5 al 13 % de los casos de hipertensión) y ayudar en la terapia y tratamiento de otras formas de hipertensión arterial.

Los ensayos de concentración de ARP y renina proporcionan información diferente sobre la renina plasmática. En primer lugar, la ARP es la expresión de la tasa de formación de angiotensina-I a través de la acción enzimática de la renina sobre su sustrato, el angiotensinógeno. Por lo tanto, la ARP depende no solo de la concentración de renina sino también de la concentración de angiotensinógeno que se ignora en los ensayos de concentración de renina. En segundo lugar, los ensayos de concentración de renina en plasma no garantizan la sensibilidad en estados bajos de renina, mientras que se puede mejorar la sensibilidad del ensayo de la ARP aumentando el tiempo de incubación durante el paso de generación. En tercer lugar, la ARP está influenciada por los inhibidores, mientras que la presencia de inhibidores no afecta que los inmunoensayos actualmente disponibles reconozcan la renina, por lo que la concentración total de renina no siempre se correlaciona con la actividad de la renina plasmática. Los médicos y químicos clínicos deben entender esas diferencias para la correcta interpretación de los ensayos [17].

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Este kit es para uso por un profesional debidamente formado (solo para uso profesional). Solo para uso *in vitro* en laboratorio.
2. Al manipular los reactivos y las muestras del kit emplee buenas prácticas de laboratorio. Ello incluye:
 - No pipetee con la boca.
 - No fume, beba o coma en las zonas donde se manipulan las muestras o los reactivos del kit.
 - Lleve ropa protectora y guantes desechables.
 - Lávese bien las manos después de realizar la prueba.
 - Evite el contacto con los ojos; use gafas de seguridad; en caso de contacto con los ojos, enjuague los ojos inmediatamente con agua y consulte a un médico.
3. Los usuarios deben tener un conocimiento profundo del presente protocolo para que la utilización de este kit sea eficaz. El rendimiento fiable solo se logrará mediante el cumplimiento estricto y cuidadoso de las instrucciones proporcionadas.
4. No utilice el kit si se ha superado la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
5. Si los reactivos del kit están visiblemente dañados, no utilice el kit de prueba.
6. No use componentes del kit de diferentes lotes de kits dentro de una prueba y no utilice ningún componente si se ha superado la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.
7. Todos los reactivos del kit y las muestras deberán estar a temperatura ambiente y mezclarse suavemente pero por completo antes de utilizar. Evitar congelar y descongelar las muestras reiteradamente.
8. Cuando se especifique utilizar agua para la dilución o reconstitución, use agua desionizada o destilada.
9. Inmediatamente después de su uso, cada componente individual del kit debe devolverse a la temperatura de almacenamiento recomendada que se indica en la etiqueta.
10. Debe establecerse una curva del calibrador para cada análisis.
11. Se recomienda a todos los clientes que preparen sus propios materiales de control o mezclas de plasma que deben incluirse en cada análisis a un nivel alto y bajo para evaluar la fiabilidad de los resultados.
12. Los controles (incluidos en el kit) deben incluirse en cada análisis y sus resultados deben estar dentro de los intervalos establecidos en el certificado de control de calidad; un resultado de control fallido puede indicar técnicas de procedimiento o pipeteo inadecuados, lavado incompleto o almacenamiento inadecuado de reactivos.
13. Al dispensar el sustrato y las soluciones de parada, no deben emplearse pipetas en las que estos líquidos entren en contacto con partes metálicas.
14. El sustrato TMB es fotosensible, debiendo permanecer incoloro si se conserva

correctamente. La aparición de un color azul podría indicar inestabilidad o contaminación, en cuyo caso no debería utilizarse.

15. No utilice plasma muy hemolizado, muy lipémico, icterico o almacenado inadecuadamente.
16. Las muestras recolectadas deben procesarse inmediatamente (centrifugarse) y el plasma debe almacenarse congelado o mantenerse a temperatura ambiente para su uso inmediato. Las muestras no deben enfriarse en hielo ni almacenarse a temperaturas entre 0 y 10 °C durante la recolección o el procesamiento, ya que esto podría conducir a una sobreestimación de la actividad de la renina.
17. Las muestras o controles que contengan azida o tiomersal no son compatibles con este kit, ya que pueden producir resultados falsos.
18. Si los valores de la muestra superan el intervalo de medición de angiotensina-I del kit ELISA, se pueden diluir y volver a analizar. Solo puede utilizarse el calibrador 0 para diluir las muestras de plasma. El uso de cualquier otro reactivo puede producir resultados falsos. Las muestras solo deben diluirse después de haber sido sometidas al procedimiento de generación de angiotensina-I.
19. Evite la contaminación microbiana de los reactivos.
20. Con objeto de evitar la contaminación de los reactivos, utilice una punta de pipeta desechable nueva para la dispensación de cada reactivo, muestra, calibrador y control.
21. Con objeto de evitar la contaminación de los reactivos, no vuelva a verter los reactivos en los recipientes originales.
22. Los reactivos del kit deben considerarse residuos peligrosos y desecharse de conformidad con la normativa local y/o nacional.
23. Los consumibles utilizados con el kit que son potencialmente biopeligrosos (por ejemplo, puntas de pipeta, frascos o recipientes que contienen materiales humanos) deben manipularse de conformidad con las prácticas de bioseguridad para minimizar el riesgo de infección y desecharse de conformidad con las normativas locales y/o nacionales relacionadas con los desechos biopeligrosos.
24. Este kit contiene 1 M de ácido sulfúrico en el componente de solución de parada. No combine ácido con residuos que contengan azida de sodio o hipoclorito de sodio.
25. Al manipular soluciones biopeligrosas o biocontaminadas, es muy recomendable el uso de gafas de seguridad y plástico desechable.
26. Es necesario realizar una calibración adecuada del equipo utilizado con la prueba, como las pipetas y el lector de microplacas de absorbancia.
27. Si fuera necesario el uso de un agitador de microplacas para el procedimiento de ensayo, el tipo y la velocidad del agitador se indican en la sección REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO, NO SUMINISTRADO. Tanto el tipo como la velocidad del agitador utilizado pueden influir en las densidades ópticas y en los resultados de las pruebas. Si se utiliza un tipo de agitador y/o velocidad diferente, el usuario será responsable de validar el rendimiento del kit.
28. No reutilice los pocillos de la microplaca, son para UN SOLO USO.
29. Para evitar condensación dentro de los pocillos de la microplaca en entornos húmedos, no abra la bolsa que contiene la microplaca hasta que alcance la temperatura ambiente.
30. Cualquier incidencia grave que se haya producido en relación con el producto deberá comunicarse al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.

LIMITACIONES

1. Esta prueba no está previsto que se use con fines de detección.
2. Esta prueba no está diseñada para pruebas caseras o de autoevaluación.
3. El kit está calibrado para la determinación de la actividad de renina en plasma humano. El kit no está calibrado para determinar la actividad de renina en otras muestras de origen humano o animal.
4. Los resultados obtenidos con este kit no deben utilizarse nunca como la única base para realizar un diagnóstico clínico o tomar decisiones terapéuticas.
5. Aunque se han evaluado sustancias que interfieren con frecuencia con esta prueba, otras sustancias que no se han evaluado, tienen el potencial de causar interferencias, como los medicamentos y la aparición de anticuerpos heterófilos en personas expuestas regularmente a animales o productos de origen animal.
6. El nivel de angiotensina-I depende de múltiples factores, incluida la actividad de la renina, la concentración de sustrato de renina, el pH plasmático, la temperatura y la selección de inhibidores. Por lo tanto, solo las muestras de plasma cuidadosamente preparadas son adecuadas para esta prueba. Las contaminaciones bacterianas, los ciclos repetidos de congelación y descongelación y la dilución de las muestras de plasma pueden afectar el resultado del ensayo.

7. La interpretación de los resultados debe reconocer que algunas condiciones pueden afectar a la secreción de renina, como la ingesta de sodio y potasio, la postura, medicamentos como diuréticos, clonidina, betabloqueantes y vasodilatadores periféricos.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD

MATERIAL DE POTENCIAL RIESGO BIOLÓGICO

Los reactivos deben considerarse potencialmente biopeligrosos y deben manipularse con las mismas precauciones que se aplicarían a la muestra sanguínea. Todas las muestras humanas deben considerarse un riesgo biológico potencial y manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones y de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.

RIESGOS QUÍMICOS

Evite el contacto directo con cualquiera de los reactivos del kit. Evite específicamente el contacto con el sustrato TMB (contiene tetrametilbencidina), la solución de parada (contiene ácido sulfúrico) y el PMSF. Si se produce el contacto con alguno de estos reactivos, lávese con abundante agua y consulte la Ficha de datos de seguridad (FDS) para obtener información adicional.

REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas de un solo canal calibradas para dispensar 5 µL, 50 µL, 250 µL y 500 µL.
2. Pipetas multicanal calibradas para dispensar 50 µL, 100 µL y 150 µL.
3. Pipetas multicanal calibradas para dispensar 300 µL (si se lava manualmente).
4. Lavador automático de microplacas (recomendado).
5. Agitador de microplacas:
- a. Agitador orbital (3 mm de diámetro) ajustado a 600 rpm o
 - b. Agitador reciproco (longitud de recorrido de 1,5 pulg) ajustado a 180 oscilaciones/minuto.
6. Puntas de pipeta desechables.
7. Agua destilada o desionizada.
8. Lector de microplacas de absorbancia calibrado con un filtro de 450 nm y un límite superior de DO de 3,0 o superior.
9. Tubos de polipropileno para procesamiento y pretratamiento de las muestras (p. ej., tubos de microcentrífuga de polipropileno).
10. Una incubadora a 37 °C.
11. Un baño de hielo a 0-4 °C.
12. Etanol (94 % o una concentración superior).
13. Baño termostático.

REACTIVOS PROPORCIONADOS

1.

	Microplaca
Contenido:	Dos microplacas de 96 pocillos (12x8) recubiertas con anticuerpo policlonal anti-angiotensina-I, cada una en una bolsa resellable con desecante.
Formato:	Listo para usar
Conservación:	2-8 °C
Estabilidad:	Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la apertura: Estable durante diez semanas.

2.

Ag	BIOT	Conjugado con biotina
Contenido:	Un frasco que contiene conjugado con angiotensina-I-biotina en un tampón de base proteica con inhibidores de la proteasa y un conservante sin mercurio.	
Formato:	Listo para usar	
Volumen:	30 mL/frasco	
Conservación:	2-8 °C	
Estabilidad:	Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la apertura: Estable durante diez semanas.	

3.	SAV	HRP	CONC	Concentrado conjugado con estreptavidina-HRP
Contenido:	un frasco que contiene conjugado con estreptavidina con peroxidasa de rábano picante en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.			
Formato:	Concentrado, requiere preparación			
Volumen:	0,5 mL/frasco			
Conservación:	2-8 °C			
Estabilidad:	Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la apertura: Estable durante diez semanas. Después de la preparación: La solución de trabajo del conjugado con HRP es estable durante 8 horas a temperatura ambiente después de la preparación.			
Preparación de la solución de trabajo del conjugado con estreptavidina-HRP:	X100	Diluir 1:100 antes de usar		Diluir 1:100 en el tampón de ensayo antes de su uso (p. ej., 20 µL de concentrado de conjugado en 1,98 mL de tampón de ensayo). Si se va a utilizar una placa completa, diluir 200 µL de concentrado de conjugado en 19,8 mL de tampón de ensayo. Tirar lo que sobre.

4.	CAL	N	Calibradores 0-7
Contenido:	Ocho botellas de calibrador que contienen concentraciones específicas de angiotensina-I. Un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo tampón con cantidades definidas de angiotensina-I. Los calibradores están calibrados con el reactivo de referencia NIBSC, código 86/536 de la Organización Mundial de la Salud. A continuación se indican concentraciones aproximadas, consulte en las etiquetas de los viales las concentraciones exactas. Concentraciones: 0, 0,2, 0,5, 1,5, 4, 10, 25, 60 ng/mL.		
Formato:	Listo para usar		
Volumen:	Calibrador 0: 2,0 mL/frasco Calibrador 1-7: 1,0 mL/frasco		
Conservación:	2-8 °C		
Estabilidad:	Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la apertura: Estable durante diez semanas.		

5.	CONTROL	N	Controles
Contenido:	Dos frascos de control que contienen diferentes concentraciones de angiotensina-I. Un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo tampón con cantidades definidas de angiotensina-I. Consulte en el certificado de control de calidad los valores objetivo y los intervalos aceptables.		
Formato:	Listo para usar		
Volumen:	1,0 mL/frasco		
Conservación:	2-8 °C		
Estabilidad:	Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la apertura: Estable durante diez semanas.		

6.	ASS	BUF	Tampón de ensayo
Contenido:	un frasco que contiene tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.		
Formato:	Listo para usar		
Volumen:	40 mL/frasco		
Conservación:	2-8 °C		
Estabilidad:	Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la apertura: Estable durante diez semanas.		

7.	BUF	Tampón de generación
Contenido:	Un frasco que contiene un tampón y un antibiótico no tóxico.	
Formato:	Listo para usar	
Volumen:	5 mL/frasco	
Conservación:	2-8 °C	
Estabilidad:	Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la apertura: Estable durante diez semanas.	
Seguridad	Consulte la Ficha de datos de seguridad del producto.	
	 Danger	

8.	PMSF	Solución de PMSF: requiere preparación
Contenido:	Dos tubos que contienen fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).	
Formato:	Requiere preparación	
Cantidad:	2 x tubos	
Conservación:	2-8 °C	
Estabilidad:	Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la preparación: Estable durante 2 meses a 2-8 °C.	
Preparación de la solución de trabajo de PMSF:	Reconstituya agregando 0,5 ml de etanol (concentración del 94 % o superior) al tubo. Tape el tubo y mezcle bien con un agitador tipo vórtex durante dos minutos para disolver completamente. Refrigere después del primer uso y mezcle con un agitador tipo vórtex nuevamente para volver a disolver el contenido antes de usar. No mantenga la botella abierta innecesariamente.	
Seguridad:	 	Consulte la Ficha de datos de seguridad del producto.
Peligro		

9.	CHROM	TMB	Sustrato de TMB
Contenido:	un frasco que contiene tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en un tampón que no contenga DMF ni DMSO.		
Formato:	Listo para usar		
Volumen:	32 mL/frasco		
Conservación:	2-8 °C		
Estabilidad:	Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la apertura: Estable durante diez semanas.		

10.	STOP	SOLN	Solución de parada
	Contenido: un frasco con ácido sulfúrico 1 M.		
	Formato: Listo para usar		
	Volumen: 12 mL/frasco		
	Conservación: 2-8 °C		
	Estabilidad: Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la apertura: Estable durante diez semanas.		
	Seguridad:  Consulte la Ficha de datos de seguridad del producto.		
Advertencia			

11.	WASH	SOLN	CONC	Tampón de lavado concentrado: Requiere preparación
Contenido:	Dos frascos que contienen tampón con un detergente no iónico y un conservante sin mercurio.			
Formato:	Concentrado, requiere preparación			
Volumen:	50 mL/frasco (Cantidad: 2 frascos)			

Conservación: 2–8 °C	
Estabilidad:	Sin abrir: Estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Después de la apertura: Estable durante diez semanas. Después de la preparación: Suponiendo que se cumplan las Buenas Prácticas de Laboratorio, la solución de trabajo de tampón de lavado es estable durante 2 semanas después de la preparación. Para evitar el crecimiento microbiano, prepare la solución de trabajo del tampón de lavado en un recipiente limpio y guárdelo refrigerado (2-8 °C) cuando no esté en uso.
Preparación de la solución de trabajo de tampón de lavado:	X10 Diluir 1:10 antes de usar Diluir 1:10 en agua destilada o desionizada antes de usar. Si se va a utilizar una de las placas completas, diluir 50 mL del tampón de lavado concentrado en 450 mL de agua desionizada.

RECOGIDA, ALMACENAMIENTO Y PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

1. Recogida y almacenamiento de las muestras

Se requieren un mínimo 0,5 mL de plasma con EDTA por cada determinación por duplicado. La recolección adecuada de muestras es esencial para la determinación precisa de angiotensina-I. La generación y degradación *in vitro* de la angiotensina-I se puede minimizar siguiendo el procedimiento de recolección y procesamiento recomendado que se indica a continuación.

1. Recoja al menos 2 mL de sangre venosa en un tubo de recolección de sangre con EDTA debidamente etiquetado.
2. Centrifugue la muestra a temperatura ambiente durante 15 minutos a 2000 g.
3. Transfiera la muestra de plasma a un nuevo tubo de almacenamiento etiquetado.
4. Si las muestras se van a analizar inmediatamente, vaya a la sección Pretratamiento de las muestras; de lo contrario, guárdelas a temperatura ambiente durante un máximo de 6 horas o congélelas a -20 °C o inferior durante un máximo de 30 días. Evite más de dos ciclos de congelación/descongelación.

Considere todas las muestras humanas como materiales de posible riesgo biológico y tome las precauciones adecuadas cuando las manipule.

2. Pretratamiento y almacenamiento de muestras

Antes de realizar la prueba, todas las muestras de plasma procesadas deben recibir un tratamiento previo de acuerdo con el procedimiento de generación de angiotensina-I que se indica a continuación. Al final de este procedimiento, habrá dos alícuotas pretratadas por muestra de plasma, una alícuota a 0 °C y una alícuota a 37 °C.

PROCEDIMIENTO DE GENERACIÓN DE ANGIOTENSINA-I

1. Si se utiliza una muestra de plasma recién procesada, continúe con el paso 2. Si se utiliza una muestra de plasma congelado, descongele la muestra rápidamente colocando el tubo en un baño termostático a temperatura ambiente.
2. Pipetee 0,5 mL de la muestra de plasma en un tubo para muestras nuevo.
3. Pipetee 5 µL de la solución de PMSF (consulte la sección Reactivos proporcionados, 8. PMSF, para instrucciones de preparación) en el tubo que contiene la muestra de plasma del paso 2 (proporción 1:100). Con un agitador tipo vórtex mezcle completamente el contenido del tubo.
4. Pipetee 50 µL del tampón de generación en el tubo que contiene la muestra tratada del paso 3 (proporción 1:10). Con un agitador tipo vórtex mezcle completamente el contenido del tubo.
5. Pipetee 0,25 mL de la muestra del paso 4 en un tubo de muestra nuevo. Ahora habrá dos alícuotas de la muestra de plasma tratada. Etiquete una como 0 °C y la otra como 37 °C.
6. Simultáneamente, coloque el tubo etiquetado como 37 °C en una incubadora a 37 °C y coloque el tubo etiquetado como 0 °C en un baño de hielo (0-4 °C) durante 90 minutos o más (no supere los 180 minutos). Asegúrese de registrar el tiempo de incubación utilizado, ya que será necesario para calcular la actividad de renina plasmática.
7. Después de finalizar el período de incubación, coloque el tubo que se encuentra a 37 °C en el baño de hielo durante 5 minutos para que se enfríe rápidamente.
8. Si las muestras generadas se analizarán inmediatamente, lleve ambos tubos de muestra (el de 0 °C y el de 37 °C) a temperatura ambiente colocándolos en un baño termostático con agua a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos. Ahora, las muestras están listas para realizar la prueba.

9. Si las muestras generadas se van a analizar más adelante, congele inmediatamente ambos tubos de muestra (el de 0 °C y el de 37 °C) a -20 °C o inferior durante un máximo de 3 meses. Antes de su uso, lleve las muestras generadas congeladas a temperatura ambiente colocándolas en un baño termostático con agua a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos. Ahora, las muestras están listas para realizar la prueba.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Pretratamiento de las muestras:



Antes de su análisis, todas las muestras que se van a analizar deben recibir un tratamiento previo (consulte la sección Pretratamiento y almacenamiento de muestras). No realice un tratamiento previo de los calibradores y los controles del kit, ya que se entregan listos para usar.

Todos los componentes del kit, los controles y las muestras deben alcanzar la temperatura ambiente antes de su uso. Los calibradores, los controles y las muestras deben analizarse por duplicado. Una vez que se haya iniciado el procedimiento, deben completarse todos los pasos sin interrupción.

1. Después de que todos los componentes del kit hayan alcanzado la temperatura ambiente, mezcle suavemente por inversión.
2. Prepare la solución de trabajo de conjugado con estreptavidina-HRP y la solución de trabajo de tampón de lavado (consulte la sección Reactivos proporcionados, 3. Concentrado conjugado con estreptavidina-HRP y 11. Tampón de lavado concentrado).
3. Prepare todas las muestras que se analizarán. Consulte la sección Pretratamiento y almacenamiento de muestras. En cada muestra de plasma, las muestras pretratadas a 0 °C y 37 °C deben analizarse juntas en la misma prueba.
4. Planifique cuántos pocillos de la microplaca se utilizarán para los calibradores, controles y muestras. Consulte la sección Diseño de ensayo recomendado. Retire las tiras del marco de la microplaca que no se utilizarán y colóquelas en la bolsa con desecante. Vuelva a sellar la bolsa con las tiras sin usar y devuélvala al frigorífico.
5. Pipetee 50 µL de cada calibrador, control y muestra pretratada (alícuotas a 0 °C y a 37 °C) en los pocillos asignados.
6. Pipetee 100 µL del conjugado con biotina en cada pocillo (se recomienda el uso de una pipeta multicanal).
7. Incube la microplaca en un agitador de microplacas** durante 60 minutos a temperatura ambiente.
8. Lave los pocillos de la microplaca con un lavador de microplacas automático (preferido) o manualmente, como se indica a continuación.

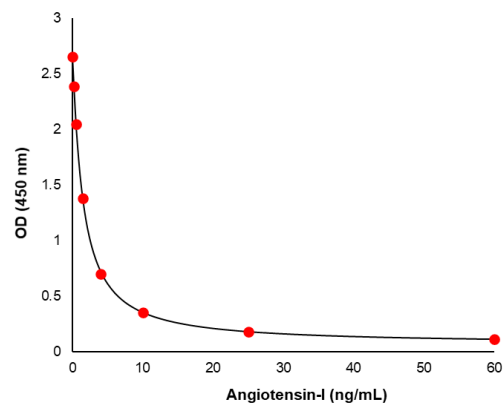
Automático: Con un lavador automático de microplacas, realice un lavado de 5 ciclos con 300 µL/pocillo de solución de trabajo de tampón de lavado (5 x 300 µL). Un ciclo consiste en aspirar todos los pocillos y después llenar cada pocillo con 300 µL de solución de trabajo de tampón de lavado. Después del ciclo de lavado final, aspire todos los pocillos y a continuación dé golpecitos con firmeza a la microplaca contra papel absorbente para eliminar cualquier líquido residual.

Manualmente: Para el lavado manual, realice un lavado de 5 ciclos con 300 µL/pocillo de solución de trabajo de tampón de lavado (5 x 300 µL). Un ciclo consiste en aspirar todos los pocillos vaciando enérgicamente el contenido de los pocillos sobre un recipiente de residuos y, a continuación, pipeteando 300 µL de solución de trabajo de tampón de lavado en cada pocillo con una pipeta multicanal. Después del último ciclo de lavado, aspire todos los pocillos vaciando rápidamente el contenido sobre un recipiente de residuos y a continuación dé golpecitos con firmeza a la microplaca contra papel absorbente para eliminar cualquier líquido residual.

9. Pipetee 150 µL de la solución de trabajo de conjugado con estreptavidina-HRP en cada pocillo (se recomienda el uso de una pipeta multicanal).
10. Incube la microplaca en un agitador de microplacas** durante 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Lave los pocillos de la microplaca nuevamente como se indica en el paso 8.
12. Pipetee 150 µL de sustrato TMB en cada pocillo (se recomienda el uso de una pipeta multicanal).

13. Incube la microplaca en un agitador de microplacas** durante 15 minutos a temperatura ambiente.
14. Pipetee 50 µL de solución de parada en cada pocillo (se recomienda el uso de una pipeta multicanal) en el mismo orden y velocidad que utilizó para la adición del sustrato TMB. Dé golpecitos suavemente en el marco de la microplaca para mezclar el contenido de los pocillos.
15. 20 minutos después de añadir la solución de parada, mida la densidad óptica (absorbancia) en los pocillos de la microplaca, utilizando un lector de microplacas de absorbancia ajustado a 450 nm.

** Consulte la sección Reactivos y equipo necesario, no suministrado para conocer las opciones del agitador de microplacas.



CÁLCULOS

- 1-Calcular la densidad óptica media de cada duplicado de calibrador, control y muestra.
- 2-Utilice un ajuste de curva de 4 o 5 parámetros con software de inmunoensayo para generar una curva de calibrador.
- 3-El software de inmunoensayo calculará las concentraciones de los controles y las muestras utilizando los valores medios de densidad óptica y la curva del calibrador.
- 4-Calculé la actividad de renina plasmática (ARP) en cada muestra, usando las concentraciones obtenidas de Angiotensina-I (Ang-I) en las alícuotas a 37 °C y a 0 °C y el tiempo de generación utilizado, mediante la siguiente ecuación:

$$PRA = \left(\frac{[Ang-I (37^{\circ}C)] - [Ang-I (0^{\circ}C)]}{Generation Time (h)} \right) \times 1.11$$

- 5-Si una lectura de alguna muestra es superior 60 ng/mL, diluya la muestra (que se ha sometido al procedimiento de generación de angiotensina-I) con el calibrador 0 a una dilución de no más de 1:10 y vuelva a analizar la muestra. El resultado obtenido debe multiplicarse por el factor de dilución.

Nota: Las muestras solo deben diluirse después de haber sido sometidas al procedimiento de generación de angiotensina-I; no diluya ninguna muestra antes de realizar el procedimiento de generación de angiotensina-I.

CONTROL DE CALIDAD

Al evaluar la validez de los resultados de la prueba, se deben evaluar los siguientes criterios:

1. La densidad óptica media del calibrador 0 cumple con el intervalo aceptable como se indica en el Certificado de control de calidad.
2. El calibrador con la concentración más alta cumple con el rango aceptable de unión porcentual como se indica en el Certificado de control de calidad. Unión porcentual = (OD del calibrador/OD del calibrador 0) x 100.
3. Los valores obtenidos para los controles del kit están dentro de los intervalos aceptables como se indica en el certificado de control de calidad.
4. Los resultados de los controles externos que se usaron cumplen con los intervalos aceptables.

DATOS TÍPICOS TABULADOS

Solo datos de muestra. No usar para calcular resultados

Calibrador	DO medio (450 nm)	Unión porcentual	Angiotensina-I (ng/mL)
0	2,654	100	0
1	2,388	90	0,2
2	2,044	77	0,5
3	1,383	52	1,5
4	0,701	26	4
5	0,353	13	10
6	0,182	7	25
7	0,114	4	60
Desconocido	1,634	-	1,0

CURVA TÍPICA DE CALIBRACIÓN

Solo curva de muestra, no usar para calcular resultados.

EFICACIA DIAGNÓSTICA

SENSIBILIDAD

El estudio de sensibilidad analítica se realizó según la directriz CLSI EP17-A2. El límite de fondo (LF), el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) tanto para la angiotensina-I como para la ARP se resumen en la siguiente tabla:

Parámetro	Angiotensina-I (ng/mL)	ARP (ng/mL/h)
LF	0,093	0,024
LD	0,166	0,059
LC	0,166	0,090

ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

Se evaluó la reactividad cruzada de los siguientes compuestos con el método de Abraham, siendo la reactividad cruzada de la DHEA del 100 %.

Compuesto	% Reactividad cruzada
Angiotensina I	100 %
Angiotensina II	<0,001 %
Angiotensina III	<0,001 %
Angiotensina 1-5	<0,001 %
Angiotensina 1-7	<0,001 %
Angiotensina 1-9	0,122 %
Sustrato de renina	0,015 %

RECUPERACIÓN

Se prepararon muestras adicionadas añadiendo cantidades definidas de angiotensina-I a tres muestras de suero del paciente. Los resultados (en ng/ml) se tabulan a continuación:

Muestra	Resultado observado	Resultado esperado	Recuperación %
1 sin adicionar	1,09	-	-
1	2,16	2,09	103,3
15	15,3	16,1	95,0
50	41,8	51,1	81,8
2 sin adicionar	1,72	-	-
1	2,70	2,72	99,3
15	16,8	16,7	100,6
50	54,1	51,7	104,6
3 sin adicionar	1,01	-	-
1	1,76	2,01	87,6
15	12,7	16,0	79,4
50	41,7	51,0	81,8

LINEALIDAD

El estudio de linealidad se realizó de acuerdo con la directriz CLSI EP06-Ed2 utilizando tres muestras de plasma humano con EDTA. Cada muestra de plasma se pretrató de acuerdo con el procedimiento de generación de angiotensina-I para producir una alícuota a 0 °C y 37 °C. Cada alícuota se diluyó con el calibrador 0 a varios niveles de concentración equidistantes y hasta una dilución de 1:10. Las muestras se analizaron por cuadruplicado y los resultados se compararon con las concentraciones anticipadas. El análisis estadístico muestra que el ensayo es suficientemente lineal hasta una dilución de 1:10 cuando se utiliza el calibrador 0 como diluyente. Los resultados (en ng/mL/h) se tabulan a continuación:

Muestra	Resultado observado	Resultado esperado	Recuperación %
1	33,7	-	-
1:2	17,9	16,9	105,9
1:4	8,33	8,43	98,8
1:10	3,24	3,37	96,1
2	7,11	-	-
1:2	3,33	3,56	93,5
1:4	1,59	1,78	89,3
1:10	0,60	0,71	84,5
3	1,66	-	-
1:2	0,68	0,83	81,9
1:4	0,33	0,42	78,6
1:10	0,13	0,17	76,5

INTERFERENCIA

Se realizó un estudio de interferencias según la directriz CLSI EP07-Ed3. Se añadieron sustancias potencialmente interferentes a tres muestras de plasma humano. No se detectaron interferencias significativas hasta las concentraciones que se muestran en la siguiente tabla.

Interferente	Concentración de la prueba
Acetaminofeno	30 µg/mL
Acetilcisteína	15 mg/dL
Ácido acetilsalicílico	3 mg/dL
Ampicilina sódica	7,5 mg/dL
Bilirrubina conjugada	20 mg/dL
Bilirrubina sin conjugar	40 mg/dL
Biotina	2,4 µg/mL
Captopril	1000 ng/mL
Disulfuro de captopril	10 µg/mL
Catepsina	100 ng/mL
Catepsina D	10 ng/mL
Cefoxitina sódica	300 mg/dL
Ciclosporina	0,18 mg/dL
Clorhidrato de doxiciclina	1,8 mg/dL
Enalaprilato dihidrato	200 ng/mL
Furosemida (Lasix)	50 µg/mL
Hemoglobina	1,25 g/L
HAMA	1000 ng/mL
Heparina	3300 U/L
Albumina de suero humano	52 g/L
Ibuprofeno	21,9 mg/dL
Insulina	150 µU/mL
Levodopa	0,75 mg/dL
Metildopa	2,25 mg/dL
metronidazol	12,3 mg/dL
Nicardipina (Loxen)	200 ng/mL
Fenilbutazona	32,1 mg/dL
Factor reumatoideo (FR)	200 UI/mL
Rifampicina	4,8 mg/dL
Teofilina	25 µg/mL
Triglicéridos	1000 mg/dL

PRECISIÓN

Los estudios de precisión se realizaron de acuerdo con la directriz CLSI EP05-A3.

REPETIBILIDAD

Un operador analizó cinco muestras de plasma con EDTA que cubrían el intervalo del ensayo (de 0,17 a 52,1 ng/mL de angiotensina-I) con un lote de kit durante 20 días, dos ciclos por día y dos mediciones repetidas por ciclo, lo que produjo un total de 80 medidas por muestra (diseño 20x2x2 para cada muestra). La posición de las muestras en la microplaca se cambió aleatoriamente de un día a otro. Los tiempos de generación de la ARP abarcaron entre 90 y 180 minutos. Los datos se analizaron con un ANOVA bidireccional anidado y se resumen en la siguiente tabla

Muestra	Media, ARP, ng/mL/h	Repetibilidad		Dentro del laboratorio	
		DE, ARP, ng/mL/h	CV	DE, PRA, ng/mL/h	CV
1	0,322	0,0367	11,4 %	0,0615	19,1 %
2	4,568	0,2060	4,5 %	0,3565	7,8 %
3	1,672	0,0768	4,6 %	0,1275	7,6 %
4	7,924	0,5005	6,3 %	0,8042	10,1 %
5	22,886	1,7496	7,6 %	3,0223	13,2 %

REPRODUCIBILIDAD

Se evaluó la reproducibilidad en tres ubicaciones utilizando un modelo de diseño experimental 3x5x5 (3 ubicaciones x 5 días de prueba x 5 repeticiones por muestra por día). El estudio incluyó cinco muestras de plasma que cubrían el intervalo de ensayo del kit y los dos controles del kit. El tiempo de generación cambió de un día a otro cubriendo el intervalo completo sugerido en estas instrucciones de uso (90-180 minutos). La posición de los controles del kit y las muestras en la microplaca se aleatorizó de un día a otro. Los datos se analizaron con un ANOVA bidireccional anidado y se resumen en la siguiente tabla.

Controles del kit	Media	Repetibilidad		Dentro de la ubicación		Reproducibilidad	
	ng/ml	DE, ng/mL	%CV	DE, ng/mL	%CV	DE, ng/mL	%CV
1	0,966	0,051	5,2	0,081	8,4	0,140	14,5
2	9,850	0,370	3,8	0,701	7,1	0,820	8,3
ARP	ng/mL /h	DE, ng/mL/h	%CV	DE, ng/mL /h	%CV	DE, ng/mL /h	%CV
S1	0,285	0,049	17,2	0,053	18,7	0,065	22,9
S2	4,416	0,247	5,6	0,596	13,5	0,596	13,5
S3	1,431	0,101	7,1	0,147	10,3	0,256	17,9
S4	7,656	0,490	6,4	0,827	10,8	0,910	11,9
S5	22,763	2,379	10,5	3,520	15,5	3,985	17,5

VALORES NORMALES ESPERADOS

Como en todos los análisis clínicos, cada laboratorio debería recoger datos y establecer su propio intervalo de valores normales esperados. Datos de referencia bibliográfica [18].

N	Media de ARP (ng/mL/h)	Intervalo ARP (percentil de 10°-90°) (ng/mL/h)
533	0,75	0,06 – 4,69

REFERENCIAS

1-Spence JD. (1999) Physiologic tailoring of therapy for resistant hypertension: 20 years' experience with stimulated renin profiling. Am J Hypertension. 12(11 Pt 1):1077-83.

2-Egan BM, Basile JN, Rehman SU, Davis PB, Grob CH, III, Riehle JF, et al. (2009) Plasma Renin test-guided drug treatment algorithm for correcting patients with treated but uncontrolled hypertension: a randomized controlled trial. Am J Hypertens. 22(7):792-801.

3-Tan ACITL, Kloppenborg PWC, Benraad TJ. (1989) Influence of Age, Posture and Intra-Individual Variation on Plasma Levels of Atrial Natriuretic Peptide. Annals of Clinical Biochemistry. 26(6):481-486.

- 4-Tiu, S. C., Choi, C. H., Shek, C. C., Ng, Y. W., Chan, F. K., Ng, C. M., & Kong, A. P. (2005). The use of aldosterone-renin ratio as a diagnostic test for primary hyperaldosteronism and its test characteristics under different conditions of blood sampling. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(1), 72–78..
- 5-Sealey JE, Gerten-Banes J, Laragh JH (1972), The renin system: Variations in man measured by radioimmunoassay or bioassay *Kidney International* 1:240-253.
- 6-Sealey, J. E., Gordon, R. D., & Mantero, F. (2005). Plasma renin and aldosterone measurements in low renin hypertensive states. *Trends in endocrinology and metabolism*. TEM, 16(3), 86–91.
- 7-J. Brossaud and J.B. Corcuff, (2009) Pre-analytical and Analytical Considerations for the Determination of Plasma Renin Activity, *Clinica Chimica Acta* 410:90–92.
- 8-F. K. Suessenbach, B. B. Burckhardt. Levels of angiotensin peptides in healthy and cardiovascular/ renal - diseased paediatric population—an investigative review. *Heart Failure Reviews* (2019) 24:709–723
- 9- <https://doi.org/10.1007/s10741-019-09797-y>
- 10- Guoqing Yao, Wenjing Li, Wenzhao Liu, et al. (2021) The Level and Significance of Circulating Angiotensin-III in Patients with Coronary Atherosclerosis. *Hindawi Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 1704762, <https://doi.org/10.1155/2021/1704762>
- 11- Valle Martins AL, da Silva FA, Bolais-Ramos L, et al. (2021) Increased circulating levels of angiotensin-(1–7) in severely ill COVID-19 patients. *ERJ Open Res* 7: 00114-2021 [DOI: 10.1183/23120541.00114-2021].
- 12- Clare A. McKinney, Caroline FATTAH, Christopher M. Loughrey et al. (2014) Angiotensin-(1–7) and angiotensin-(1–9): function in cardiac and vascular remodelling. *Clinical Science*. 126, 815–827 (Printed in Great Britain) doi: 10.1042/CS20130436
- 13- Stirati G, de Martino A, Mene P, et al. (1983) Plasma renin activity: effect of temperature during blood processing. *J Clin Chem Clin Biochem* 529-31
- 14- Ruth Lapworth, Sally E Green and Frances Short. (1990) In vitro stability of assayed renin activity in plasma and whole blood. *Ann Clin Biochem* 27: 78-79
- 15- Zoltan Locsei, Karoly Racz, Attila Patocs et al. (2009). Influence of sampling and storage conditions on plasma renin activity and plasma renin concentration. *Clinica Chimica Acta* 402 203–205
- 16- Morganti, A; Lonati, C; Turolo, L (2010) Brief Cryoactivation Markedly Affects Plasma Renin Activity and Direct Renin Measurement in Low Renin Samples: PP.24.473, *Journal of Hypertension*: 28 p e388 doi: 10.1097/01.hjh.0000379399.50039.3c.
- 17- Sealey JE. (1991) Plasma renin activity and plasma prorenin assays. *Clin Chem*. 37(10 Pt 2):1811-9. PMID: 1914195.
- 18- Campbell, D. J., Nussberger, J., Stowasser, M., Danser, A. H., Morganti, A., Frandsen, E., & Ménard, J. (2009). Activity assays and immunoassays for plasma Renin and prorenin: information provided and precautions necessary for accurate measurement. *Clinical chemistry*, 55(5), 867–877.
- 19- Brossaud J, Corcuff JB. Pre-Analytical and Analytical Considerations for the Determination of Plasma Renin Activity. *Clin Chim Acta*. 2009; 410(1–2):90–2.