
RENCTK
(P2721)



English	p. 1
Italiano	p. 8
Français	p. 15
Deutsch	p. 23
Español	p. 31
Português	p. 39
Magyar	p. 46
Cesky	p. 53
Ελληνικά	p. 60

ANGIOTENSIN I RADIOIMMUNOASSAY KIT
Procedure for measurement of plasma renin activity (PRA)
by quantitative determination of angiotensin I
in human plasma samples

For in vitro use only

1. INTRODUCTION

Renin, a proteolytic enzyme with a molecular weight of approx. 40,000 daltons, is released from the juxtaglomerular cells of the kidney. This enzyme cleaves to its substrate, angiotensinogen, forming a decapeptide, angiotensin I, of molecular weight approx. 1,300 daltons. This polypeptide is further hydrolyzed by the converting enzyme (ACE) into the biologically active octapeptide angiotensin II.

The hormonal product of the renin-angiotensin system, angiotensin II, has an extremely short in vivo half-life, but it is the most potent vasopressor known; its main effects are vasoconstriction, stimulation of the sympathetic nervous system and stimulation of aldosterone secretion by the adrenal glands.

Since angiotensin I levels are a direct representation of plasma renin activity, the determination of plasma renin activity has been widely adopted to evaluate the renin-angiotensin system in disease states. Measurement of plasma renin activity (PRA) in hypertensives is an important aid in the differential diagnosis of primary and secondary aldosteronism.

Different factors influence renin secretion, which is inhibited by plasma levels of angiotensin II and ADH, by increased sodium and potassium retention and by increased renal perfusion pressure. On the contrary, sodium and potassium depletion, a reduced renal perfusion pressure and the activity of sympathetic nervous system, all result in an increased renin secretion.

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The measurement of renin activity consists of radioimmunoassay of angiotensin I. The main steps of the assay procedure are:

- generation of angiotensin I in plasma samples during an incubation at 37°C under conditions which prevent the degradation of angiotensin I (presence of enzymatic inhibitor PMSF) and are considered most suitable for renin activity
- angiotensin I coated-tube radioimmunoassay in two aliquots of the same sample, one incubated at 37°C for generation and one non-incubated (sample blank).

The principle of the radioimmunoassay is based on the competition between labelled angiotensin I and angiotensin I contained in calibrators or samples to be assayed for a fixed and limited number of antibody binding sites. After the RIA incubation, the amount of labelled angiotensin I bound to the antibody coated on the tube walls is inversely related to the concentration of unlabelled angiotensin I present in calibrators or samples. The method adopted for B/F separation is based on the use of antibody-coated tubes, where the antibody is coated on the tube walls.

3. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

Coated tubes	100
¹²⁵ I-labelled angiotensin I	2 vials
Angiotensin I calibrators	6 vials
Control plasma	1 vial
Generation buffer	1 vial
Enzymatic inhibitor (PMSF)	1 vial
Number of tubes	100

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Once opened, the reagents of this kit are stable until the kit expiry date when properly stored. The kit has been designed to perform 3 assay runs when reagents are stored as the manufacturer recommends.

Reagents should not be used past the expiry date. The expiry date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiry date of the tracer. The expiry date of each component is reported on the respective vial label.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming.

Reagents from different batches must not be mixed.

3.1. Coated tubes

The inner surface of each tube is coated with biotinylated angiotensin I IgG raised in rabbits.

Before use, bring the coated tubes to room temperature prior to opening the box, to avoid condensation of humidity. Securely reseal the box containing unused tubes. Do not mix different batches of coated tubes.

3.2. ¹²⁵I-labelled ileu-5-angiotensin I (red): lyophilized reagent

Each vial contains the hormone labelled with ¹²⁵I, BSA, phosphate buffer, stabilizers, preservatives and an inert red dye. Radioactivity is 81 kBq (2.2 µCi) or less per vial on the calibration date.

Reconstitute the contents of each vial with 26 mL distilled water. Store the resulting solution in deep-frozen aliquots (-20°C or below).

3.3. Ilev-5-angiotensin I calibrators: lyophilized reagent

The vials contain increasing amounts of angiotensin I, BSA, phosphate buffer and preservatives.

Reconstitute the contents of each vial with 1 mL distilled water. The resulting solutions contain 0 - 0.3 - 1 - 3 - 10 - 50 ng/mL respectively and should be stored in deep-frozen aliquots (-20°C or below). *The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as the manufacturer recommends.*

3.4. Control plasma: lyophilized reagent

The vial contains human plasma and preservatives. The range of concentrations of each control is reported on the certificate of analysis and indicates the limits established by DiaSorin for control values that can be obtained in reliable assay runs.

Reconstitute the vial contents with 2 mL chilled distilled water, taking care that the temperature does not exceed 4°C . Store the resulting solution in deep-frozen aliquots (-20°C or below).

The control plasma must be treated as a specimen and angiotensin I should be generated for 90 min at 37°C before assaying.

3.5. Generation buffer (blue): ready-to-use reagent

The vial contains 4 mL citrate buffer solution, stabilizers, preservatives and an inert blue dye.

3.6. Enzymatic inhibitor (PMSF): ready-to-use reagent

The vial contains 1.0 mL 5% phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) (R 23/24/25, S 36, S 45) ethanol solution (R 11, S 7, S 16).

If crystallization occurs at $2-8^{\circ}\text{C}$, warm the PMSF solution to 37°C .

4. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

- Distilled or deionized water.
- Glassware.
- Disposable polystyrene tubes.
- Test tube rack.
- Micropipettes with disposable tips (10, 50, 200, 500 μL) (10, 50 μL : trueness $\pm 3\%$, precision 2%; 200, 500 μL : trueness $\pm 2\%$, precision 1%).
- Vortex mixer.
- Thermostatically-controlled water bath capable of maintaining $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Device for aspiration of incubation mixture.
- Gamma counter suitable for counting ^{125}I (counter window setting: 15-80 keV - counter efficiency: 70% - counting time: 1 min). If counter efficiency is below 60%, counting time should be prolonged to 2 min.

5. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Specimen collection

Careful standardization of the patient preparation and sampling conditions is strongly recommended. Blood should be collected in pre-chilled tubes with sodium EDTA as an anticoagulant.

The blood samples must not be withdrawn using heparin as an anticoagulant, as it interferes with angiotensin I generation. Conversely, EDTA offers the advantage of being a suitable anticoagulant, whilst simultaneously assisting in the inhibition of the converting enzyme.

The samples must be kept cold and centrifuged in the cold at about $2000 \times g^*$ to recover the plasma. Samples having particulate matter, turbidity, lipaemia, or erythrocyte debris may require clarification by filtration or centrifugation before testing. Grossly haemolyzed or lipaemic samples as well as samples containing particulate matter or exhibiting obvious microbial contamination should not be tested. If the assay is not immediately performed, the samples should be aliquoted and stored deep-frozen (-20°C or below) until assayed. If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing, taking care that the temperature does not exceed 4°C . Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Angiotensin I generation

Angiotensin I generation at pH 6.0 is performed under optimal conditions with subsequent better sensitivity for low renin activity samples and possible use of shorter generation times. The chosen generation conditions allow working with the lowest sample dilution possible thus reducing the effect of dilution on angiotensin I generation kinetics.

- Add the following reagents into **non-coated** generation tubes kept in an ice bath, **strictly respecting this order**:

- . 500 μL sample
- . 10 μL PMSF
- . 50 μL generation buffer.

- Mix the contents of tubes with a Vortex and transfer 200 μL of each sample into a second series of non-coated tubes.
- Incubate the second series of tubes for 90 min at 37°C in a thermostatically-controlled water bath, while keeping in an ice bath the first series of samples (sample blanks).

The suggested generation time is the average time that allows PRA determination in many physiopathological conditions. When either higher or lower PRA values are expected, this time should be either reduced or prolonged (Fig. 1).

- After the 37°C incubation, the generation tubes must be immediately placed in an ice bath.

6. ASSAY PROCEDURE

Perform the assay at room temperature ($20-25^{\circ}\text{C}$) at least in duplicate. Calibrators must be tested directly in the RIA procedure with coated tubes, without previously generating angiotensin I and must be run with each series of patient specimens. Calibrators and samples should be subjected to the same process and incubation time.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps. A clean, disposable tip should be used for dispensing each calibrator and sample.

- Dispense reagents *in the bottom of coated tubes*. Operate according to the following scheme:

	Calibrators 0-5	Samples & blanks
Calibrators	50 µL	-
Samples	-	50 µL
Tracer	500 µL	500 µL

- **Mix** the contents of tubes with a Vortex and **incubate** for a time ranging **from 3 to 24 hours at room temperature**.
- Carefully **aspirate** the incubation mixture. *Be sure that the aspirator tip touches the bottom of the coated tube so that all the liquid is removed. Failure to remove adhering solution adequately may result in poor reproducibility and spurious results. No trace of dye should still be visible.*
- **Measure the radioactivity** of tubes.

7. CALCULATION OF RESULTS

Compute the mean net counts for each group of tubes. Compute the B/Bo ratio for each calibrator and unknown sample as follows:

$$B/Bo\% = \frac{\text{calibrator or sample mean counts}}{\text{zero calibrator mean counts}} \times 100$$

Plot in semilog coordinates the mean percent value for each calibrator on the ordinate (y axis) as a function of angiotensin I concentration expressed as ng/mL on the abscissa (x axis). A calibration curve is thus obtained (Fig. 2).

Plasma renin activity (PRA) is calculated as ng angiotensin I generated/mL/hour, following the procedure herebelow:

- directly from the calibration curve, read the angiotensin I concentration generated in each sample incubated at 37°C and in the respective sample blank (kept in an ice bath)
- subtract the corresponding blank value from each sample value
- multiply the obtained value by 1.12 as samples are initially diluted 1:1.12
- divide the concentration obtained by the generation time (hours):

$$PRA = \frac{(\text{ng } 37^\circ\text{C} - \text{ng } 4^\circ\text{C}) \times 1.12}{\text{hours of incubation}} = \text{ng/mL/hour.} \quad (1)$$

If generation time lasted 1.5 hours, equation (1) may be so simplified:

$$PRA = (\text{ng } 37^\circ\text{C} - \text{ng } 4^\circ\text{C}) \times 0.747 = \text{ng/mL/hour.}$$

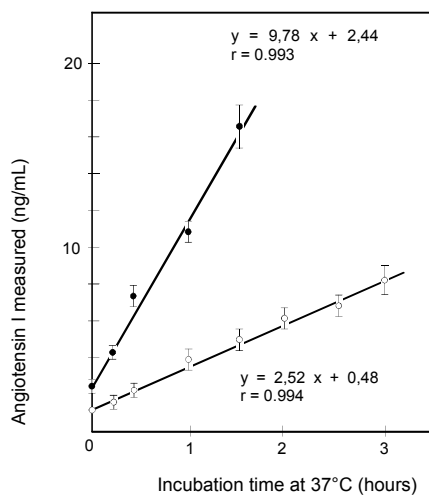


Fig. 1 - Check of the linearity of angiotensin I generation with increasing incubation time at 37°C, pH 6.0.

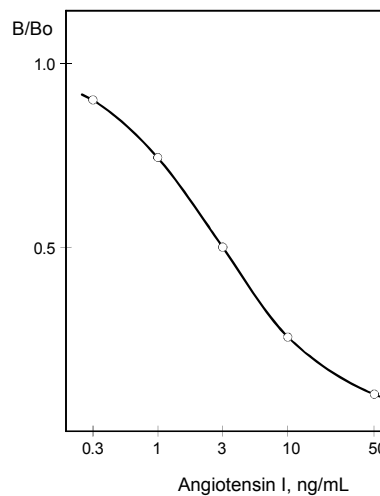


Fig. 2

$$*g = (1118 \times 10^{-8})(\text{radius in cm})(\text{rpm})^2$$

Calculation example

The following data must only be considered an example and should not be employed instead of the data obtained by the user.

Description	cpm	B/Bo x 100
Zero calibrator	19,230	100
0.3 ng/mL	17,692	92.0
1 ng/mL	14,519	75.5
3 ng/mL	9,807	51.0
10 ng/mL	5,000	26.0
50 ng/mL	2,115	11.0
Sample blank	17,499	91.0
Sample	9,038	47.0

By interpolation from the calibration curve and using equation (1), the sample is found to contain a plasma renin activity of 2.39 ng/mL/hour.

$$\text{PRA} = \frac{(3.5 - 0.3) \times 1.12}{1.5} = 2.39 \text{ ng/mL/hour.}$$

8. EXPECTED VALUES

The ranges given below are merely indicative for a sodium intake of 100-150 mEq/24 hours; each laboratory should establish its own reference ranges.

Generation at pH 6.0 PRA, ng/mL/hour	Supine position	Upright position
	0.2 - 2.8	1.5 - 5.7

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1. Analytical specificity

Analytical specificity may be defined as the ability of the assay to accurately detect specific analyte in the presence of potentially interfering factors in the sample matrix (e.g., haemolysis, effects of sample treatment), or cross-reactive analytes.

Since in this particular case the amount of substance to be assayed is generated in vitro and the sample blank is subtracted, the actual specificity of angiotensin I antibody is not critical.

However, rather than cross-reactions with circulating angiotensin-related peptides, the interference of sample proteins (sample blank) can set some limitations to the assay sensitivity. The overall sample blank includes the contributions of angiotensin-like proteins, circulating angiotensin I and angiotensin I produced by the renin action at low temperature from the time of blood collection to the assay.

Interference. Controlled studies of potentially interfering substances or conditions showed that the assay performance was not affected by lipaemia (up to 500 mg/dL triglycerides), bilirubinaemia (up to 20 mg/dL bilirubin). Angiotensin I values determined in samples containing 1000 mg/dL haemoglobin are about 10% lower than those determined in normal samples.

Cross-reactions. The percentage of cross-reactions by some angiotensin-related peptides, calculated according to Abraham, shows the specificity of the antibody used.

- Angiotensin I 100%
- Angiotensin II < 0.1%
- Heptapeptide, hexapeptide << 0.02%

9.2. Analytical sensitivity

Analytical sensitivity may also be expressed as the limit of detection, which is the minimal amount of specific analyte detectable by the assay. The limit of detection is 0.20 ng/mL at 95% confidence limit. This was calculated as the apparent concentration of analyte which was distinguishable from the zero calibrator, that is, two standard deviations below zero.

9.3. Precision

Different sample pools, at different PRA values, were assayed to determine repeatability and reproducibility of the assay (i.e., within- and between-assay variability).

Repeatability	A	B	C
Number of determinations	10	10	10
Mean (ng/mL/hour)	2.3	8.8	13.5
Standard deviation	0.17	0.48	1.34
Coefficient of variation (%)	7.5	5.4	9.9

Reproducibility	A	B	C
Number of determinations	10	10	10
Mean (ng/mL/hour)	2.6	8.6	13.0
Standard deviation	0.20	0.70	1.50
Coefficient of variation (%)	7.7	8.1	11.5

9.4. Trueness

The assay trueness has been checked by the dilution and recovery tests.

Dilution test. Two plasma samples with high angiotensin I concentration were tested after serially diluting with the zero calibrator.

Dilution	Expected concentration, ng/mL	Measured concentration, ng/mL	% Recovery
neat	–	17.5	–
1:2	8.75	8.6	98.3
1:4	4.38	4.5	102.9
1:8	2.19	2.3	105.1
1:16	1.09	1.1	100.6
neat	–	8.5	–
1:2	4.25	4.4	103.5
1:4	2.13	2.2	103.5
1:8	1.06	1.1	103.5
1:16	0.53	0.5	94.1

Recovery test. Two plasma samples with low angiotensin I concentration were tested as such and after mixing with increasing amounts of angiotensin I.

Added concentration, ng/mL	Expected concentration, ng/mL	Measured concentration, ng/mL	% Recovery
–	–	11.2	–
1.5	7.1	7.0	98.6
5.0	10.6	10.7	100.9
25.0	30.6	30.0	98.0
–	–	15.6	–
1.5	9.3	9.1	97.8
5.0	12.8	12.2	95.3
25.0	32.8	30.7	93.6

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The clinical significance of the PRA assay is unreliable, if performed on patients who are not kept under controlled conditions of sodium and potassium intake and of posture, or have been administered with drugs such as diuretics, chlonidine, beta-blocking agents, estroprogestogens, peripheral vasodilators which affect renin secretion.

Diagnosis should not be established on the basis of a single test result, but should be determined in conjunction with clinical findings and other diagnostic procedures as well as in association with medical judgement.

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimens may affect the assay results.

A skillful technique and strict adherence to the instructions are necessary to obtain reliable results. In particular, precise pipetting and accurate aspiration are essential.

Non-reproducible results may arise from methodological factors, such as:

- cross-exchange of vial caps
- use of the same tip when withdrawing from different vials or dispensing different samples
- leaving the vials open for long
- exposure of reagents or samples to intense heat or heavy sources of bacterial contamination
- inadequate aspiration of incubation mixture
- contamination of tube rims by tracer or samples
- casual oscillations or inadequate handling of the gamma counter
- use of reagents from different master batches.

11. WARNINGS AND PRECAUTIONS

Test components contain sodium azide as a preservative. Because sodium azide may form explosive lead or copper azide in plumbing, it is recommended that drains be thoroughly flushed with water after disposal of solutions containing sodium azide (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Harmful if swallowed.

R 31 – Contact with acids liberates toxic gas.

S 28 – After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

S 45 – In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

PMSF (Council Directive 99/45/EC):

R 22 – Harmful if swallowed.

R 36/38 – Irritating to eyes and skin.

S 45 – In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

Ethanol (Council Directive 99/45/EC):

R 11 – Highly flammable.

S 7 – Keep container tightly closed.

S 16 – Keep away from sources of ignition. No smoking.

All serum and plasma units used to produce the components provided in this kit have been tested for the presence of HBsAg, anti-HCV, and anti-HIV-1/2 and found to be non-reactive. As, however, no test method can offer absolute assurance that pathogens are absent, all specimens of human origin should be considered potentially infectious and handled with care.

12. SAFETY PRECAUTIONS

- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in the assay laboratory.
- Do not pipette solutions by mouth.
- Avoid direct contact with all potentially infectious materials by using protective clothing such as lab coats, protective glasses and disposable gloves. Wash hands thoroughly at the end of each assay.
- Avoid splashing or forming an aerosol. Any reagent spills should be washed with a 5% sodium hypochlorite solution and disposed of as though potentially infectious.
- All samples, biological reagents and materials used in the assay must be considered potentially able to transmit infectious agents. They should therefore be disposed of in accordance with the prevailing regulations and guidelines of the agencies holding jurisdiction over the laboratory, and the regulations of each Country. Disposable materials must be incinerated; liquid waste must be decontaminated with sodium hypochlorite at a final concentration of 5% for at least half an hour. Any materials to be reused must be autoclaved using an *overkill* approach (USP 24, 2000, p. 2143). A minimum of one hour at 121°C is usually considered adequate, though the users must check the effectiveness of their decontamination cycle by initially validating it and routinely using biological indicators.

13. BASIC RULES OF RADIATION SAFETY

Reagents Containing Iodine-125

This kit contains radioactive material that does not exceed 2.1 μCi (76 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed, and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

ATTENTION: Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

SCHEME OF THE ASSAY

- 1 - RECONSTITUTE REAGENTS.
- 2 - PERFORM ANGIOTENSIN I GENERATION FOR 90 MIN AT 37°C IN NON-COATED TUBES.
- 3 - IDENTIFY COATED TUBES FOR THE RIA ASSAY IN DUPLICATE.
- 4 - DISPENSE REAGENTS BY THE FOLLOWING SCHEME AND MIX THE INCUBATION MIXTURE:

	TUBES	CAL 0-5	SAMPLES & BLANKS
REAGENTS			
CALIBRATORS		50 μ L	-
SAMPLES		-	50 μ L
TRACER		500 μ L	500 μ L

- 5 - INCUBATE FOR A TIME RANGING FROM 3 TO 24 HOURS AT ROOM TEMPERATURE.
- 6 - CAREFULLY ASPIRATE THE INCUBATION MIXTURE.
- 7 - MEASURE THE RADIOACTIVITY OF TUBES.

KIT PER IL DOSAGGIO RADIOIMMUNOLOGICO DELL'ANGIOTENSINA I

Procedimento per la misura dell'attività reninica plasmatica (PRA) mediante dosaggio quantitativo della angiotensina I in campioni di plasma umano

Solo per uso in vitro

1. INTRODUZIONE

La renina è un enzima proteolitico con peso molecolare 40.000 dalton ca., prodotto dall'apparato juxtaglomerulare del rene. Quest'enzima scinde il suo substrato, l'angiotensinogeno, formando un decapeptide, l'angiotensina I, di peso molecolare 1.300 dalton ca. Questo polipeptide viene successivamente idrolizzato dall'enzima di conversione (ACE) nell'octapeptide biologicamente attivo, l'angiotensina II.

Il prodotto ormonale del sistema renina-angiotensina, l'angiotensina II, ha un'emivita biologica estremamente breve, ma è il più potente vasocostrittore conosciuto; i suoi effetti principali sono la vasocostrizione, la stimolazione del sistema nervoso simpatico e la stimolazione della secrezione dell'aldosterone da parte del surrene.

Poiché i livelli di angiotensina I sono una diretta rappresentazione dell'attività reninica plasmatica, la misura di quest'ultima è stata ampiamente adottata per valutare il sistema renina-angiotensina in condizioni patologiche. La misura dell'attività reninica plasmatica (PRA) negli ipertesi è di importante aiuto nella diagnosi differenziale di aldosteronismo primario e secondario.

Diversi fattori influiscono sulla secrezione della renina, che viene inibita dai livelli plasmatici di angiotensina II e di ADH, da una più alta ritenzione di sodio e potassio e da una maggiore pressione di perfusione renale. D'altra parte, una carenza di sodio e potassio, una ridotta pressione di perfusione renale e l'attività del sistema nervoso simpatico inducono una maggiore secrezione di renina.

2. PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

La misura dell'attività reninica è basata sul dosaggio radioimmunologico dell'angiotensina I. Due sono le fasi essenziali del procedimento:

- generazione di angiotensina I in campioni di plasma mediante incubazione a 37°C in condizioni atte a prevenire la degradazione enzimatica dell'angiotensina I (presenza dell'inibitore enzimatico PMSF) e considerate le più indicate per l'attività reninica
- dosaggio radioimmunologico di angiotensina I in provette sensibilizzate su due aliquote dello stesso campione, una incubata a 37°C per la generazione e una non incubata (bianco del campione).

Il principio del dosaggio radioimmunologico consiste nella competizione tra angiotensina I marcata e angiotensina I contenuta nei calibratori o nei campioni per il numero fisso e limitato di siti anticorpali. Dopo l'incubazione RIA, la quantità di angiotensina I marcata legata all'anticorpo fissato alle provette sensibilizzate è inversamente proporzionale alla concentrazione di angiotensina I non marcata presente nei calibratori o nei campioni. Il metodo adottato per la separazione libero/legato è basato sull'impiego delle provette sensibilizzate, dove l'anticorpo è fissato alle pareti delle provette.

3. REATTIVI FORNITI NEL KIT

Provette sensibilizzate	100
Angiotensina I marcata con ¹²⁵ I	2 flaconi
Calibratori di angiotensina I	6 flaconi
Plasma di controllo	1 flacone
Tampone di generazione	1 flacone
Inibitore enzimatico (PMSF)	1 flacone
Numero di dosaggi	100

MODALITÀ DI CONSERVAZIONE: Al momento dell'arrivo, conservare il kit a 2-8°C. Non congelare. Dopo l'apertura, i reattivi di questo kit sono stabili fino alla data di scadenza del kit se conservati in modo adeguato. Il kit è garantito per 3 serie analitiche se i reattivi sono conservati secondo quanto raccomandato dal fabbricante.

Non usare i reattivi oltre la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e corrisponde alla data di scadenza del tracciante. La data di scadenza di ciascun componente è riportata sulle etichette dei rispettivi flaconi.

Nel ricostituire il contenuto dei flaconi, agitare delicatamente per evitare la formazione di schiuma.

Non mescolare reattivi provenienti da lotti differenti.

3.1. Provette sensibilizzate

La superficie interna di ciascuna provetta è rivestita con IgG di coniglio anti-angiotensina I biotinilate.

Al momento dell'uso, portare le provette sensibilizzate a temperatura ambiente prima di aprire il contenitore, per evitare condensazione d'umidità.

Le provette non utilizzate vanno conservate nel contenitore ben chiuso. Non mescolare lotti differenti di provette sensibilizzate.

3.2. I-Ieu-5-angiotensina I marcata con ¹²⁵I (rossa): reattivo liofilo

Ogni flacone contiene ormone marcato con ¹²⁵I, sieroalbumina bovina, tampone fosfato, stabilizzanti, conservanti e un colorante rosso inerte. La radioattività massima è 81 kBq (2,2 µCi) per flacone alla data di taratura. Ricostituire il contenuto di ciascun flacone con 26 mL di acqua distillata. Conservare la soluzione risultante in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori.

3.3. Calibratori d'ileu-5-angiotensina I: reattivo liofilo

Ogni flacone contiene quantità crescenti di angiotensina I, sieroalbumina bovina, tampone fosfato e conservanti.

Ricostituire il contenuto di ogni flacone con 1 mL di acqua distillata. Le soluzioni risultanti contengono rispettivamente 0 - 0,3 - 1 - 3 - 10 - 50 ng/mL e devono essere conservate in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori. *I calibratori del kit sono commutabili con i campioni in esame quando sono utilizzati con i reattivi e la procedura operativa di questo test diagnostico in vitro, secondo quanto raccomandato dal fabbricante.*

3.4. Plasma di controllo: reattivo liofilo

Il flacone contiene plasma umano e conservanti. Il range delle concentrazioni di ogni controllo è riportato sul certificato di analisi ed indica i limiti stabiliti da DiaSorin per i valori di controllo ottenibili in sessioni di analisi affidabili.

Ricostituire il contenuto del flacone con 2 mL di acqua distillata fredda, evitando che la temperatura superi i 4°C . Conservare la soluzione risultante in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori.

Il plasma di controllo deve essere trattato come un campione e l'angiotensina I generata per 90 min a 37°C prima del dosaggio.

3.5. Tampone di generazione (blu): reattivo pronto per l'uso

Il flacone contiene 4 mL di soluzione di tampone citrato, stabilizzanti, conservanti ed un colorante blu inerte.

3.6. Inibitore enzimatico (PMSF): reattivo pronto per l'uso

Il flacone contiene 1,0 mL di fenilmetilsulfonyl fluoruro (PMSF) al 5% (R 23/24/25, S 36, S 45) in soluzione di etanolo (R 11, S 7, S 16). Se il prodotto a $2-8^{\circ}\text{C}$ tende a cristallizzare, riscaldarlo a 37°C .

4. ATTREZZATURE E REATTIVI AUSILIARI

- Acqua distillata e deionizzata.
- Vetreria.
- Provette in plastica monouso.
- Portaprovette.
- Micropipette con puntali monouso da 10, 50 μL (esattezza $\pm 3\%$, precisione 2%) e 200, 500 μL (esattezza $\pm 2\%$, precisione 1%).
- Agitatore Vortex.
- Bagno termostatico in grado di mantenere $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Sistema per aspirare la miscela di incubazione.
- Contatore gamma per contare lo iodio ^{125}I (impostazione della finestra del contatore: 15-80 keV - efficienza del contatore: 70% - tempo di conteggio: 1 min). Se l'efficienza del contatore è inferiore al 60%, si deve prolungare il tempo di conteggio a 2 min.

5. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Prelievo dei campioni

Si raccomanda di standardizzare accuratamente la preparazione del paziente e le condizioni di prelievo del campione. Si consiglia di raccogliere il sangue in provette prerrefrigerate con EDTA sodico come anticoagulante. *I campioni di sangue non devono essere prelevati usando eparina come anticoagulante, dal momento che questa interferisce con la generazione di angiotensina I. Al contrario, l'EDTA presenta il vantaggio di essere un efficace anticoagulante e di contribuire nel contempo all'inibizione dell'enzima di conversione.*

I campioni devono essere mantenuti a $2-8^{\circ}\text{C}$ e quindi centrifugati a freddo a circa 2000 gravità per separare il plasma. Chiarificare per filtrazione o centrifugazione prima del test i campioni che presentano materiale in sospensione, opalescenza, lipemia o residui eritrocitari. Non usare campioni fortemente emolizzati o lipemici, né campioni che presentano materiale in sospensione o evidente contaminazione microbica. Se il dosaggio non viene eseguito immediatamente, i campioni devono essere suddivisi in aliquote e congelati a -20°C o a temperature inferiori fino al momento del dosaggio. Se i campioni sono stati scongelati, agitare con cura prima di dosarli, evitando che la temperatura superi i 4°C . Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

Generazione di angiotensina I

La generazione di angiotensina I a pH 6,0 si svolge in condizioni ottimali per l'azione della renina con conseguente migliore sensibilità per i campioni a bassa attività reninica e possibile utilizzazione di tempi di generazione più brevi. Le condizioni di generazione prescelte consentono di operare con la minima diluizione possibile del campione, riducendo l'effetto della diluizione sulla cinetica di generazione di angiotensina I.

- Aggiungere i reattivi in provette di generazione **non sensibilizzate** tenute in bagno di ghiaccio, **rispettando strettamente questo ordine**:
 - . 500 μL di campione
 - . 10 μL di PMSF
 - . 50 μL di tampone di generazione.
- Agitare il contenuto delle provette su Vortex e trasferire 200 μL di ciascun campione in una seconda serie di provette non sensibilizzate.
- Incubare la seconda serie di provette in bagno termostatico a 37°C per 90 min e mantenere la prima serie di provette in bagno di ghiaccio (bianchi dei campioni). *Il tempo di generazione suggerito è un tempo medio che consente una generazione di angiotensina I sufficiente per valutare la maggior parte delle condizioni fisiopatologiche. Quando si prevedono valori più alti o più bassi, il tempo di generazione può essere rispettivamente abbreviato oppure prolungato, dal momento che la quantità di angiotensina I generata è una funzione lineare del tempo (Fig. 1).*
- Dopo l'incubazione a 37°C le provette di generazione devono essere immediatamente trasferite in bagno di ghiaccio.

6. PROCEDIMENTO OPERATIVO

La distribuzione dei reattivi deve essere fatta a temperatura ambiente (20–25°C) prevedendo determinazioni almeno in duplicato. I calibratori devono essere usati direttamente nel dosaggio RIA con provette sensibilizzate senza sottoporli preventivamente alla generazione di angiotensina I. Eseguire la determinazione dei calibratori per ogni serie di campioni analizzati. Il procedimento operativo deve essere rigorosamente identico per calibratori e campioni in esame.

Eseguire le fasi del dosaggio nell'ordine previsto, senza interruzioni.

Utilizzare un puntale monouso nuovo per dispensare calibratori e campioni.

- Distribuire i reattivi *sul fondo delle provette sensibilizzate*. Operare secondo lo schema seguente:

provette	CALIBRATORI	CAMPIONI E BIANCHI
reattivi	0-5	
CALIBRATORI	50 µL	–
CAMPIONI	–	50 µL
TRACCIANTE	500 µL	500 µL

- **Agitare** il contenuto delle provette su Vortex ed **incubare da 3 a 24 ore a temperatura ambiente**.
- **Aspirare** accuratamente la miscela di incubazione. *Verificare che l'eliminazione del liquido sia completa, assicurandosi che il puntale della pipetta di aspirazione tocchi il fondo delle provette sensibilizzate. La presenza di gocce aderenti alle pareti delle provette sensibilizzate può provocare scarsa riproducibilità o risultati non affidabili. Non deve restare traccia del colorante.*
- **Misurare la radioattività** delle provette.

7. CALCOLO DEI RISULTATI

Calcolare la media dei conteggi per ogni gruppo di provette, dopo aver sottratto il valore del fondo. Esprimere la media dei conteggi di calibratori e campioni come percentuale rispetto al calibratore zero:

$$B/B_0\% = \frac{\text{conteggio medio calibratori o campioni}}{\text{conteggio medio calibratore zero}} \times 100$$

Riportare su grafico semilog la percentuale media calcolata per ciascun calibratore sulle ordinate (asse delle y) in funzione della concentrazione di angiotensina I espressa in ng/mL sulle ascisse (asse delle x). Si ottiene così una curva di taratura (Fig. 2).

L'attività reninica plasmatica (PRA) è calcolata in ng di angiotensina I generati per mL per ora, con il procedimento indicato:

- leggere direttamente dalla curva di taratura la concentrazione di angiotensina I generata per ciascun campione incubato a 37°C e per il rispettivo bianco del campione (mantenuto in bagno di ghiaccio)
- sottrarre dal valore di ciascun campione il valore del bianco corrispondente
- moltiplicare il valore ottenuto per 1,12 poiché il campione era stato inizialmente diluito 1:1,12
- dividere le concentrazioni ottenute per il tempo di generazione espresso in ore:

$$PRA = \frac{(\text{ng } 37^\circ\text{C} - \text{ng } 4^\circ\text{C}) \times 1,12}{\text{ore di incubazione}} = \text{ng/mL/ora.} \quad (1)$$

Per un tempo di generazione di 1,5 ore la formula (1) può essere così semplificata:

$$PRA = (\text{ng } 37^\circ\text{C} - \text{ng } 4^\circ\text{C}) \times 0,747 = \text{ng/mL/ora.}$$

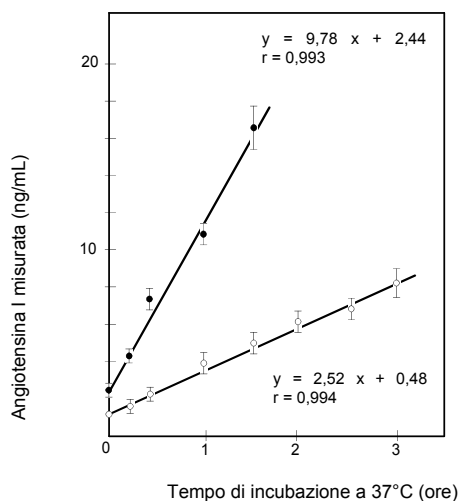


Fig. 1 - Controllo della linearità della generazione di angiotensina I aumentando il tempo di incubazione a 37°C, pH 6,0

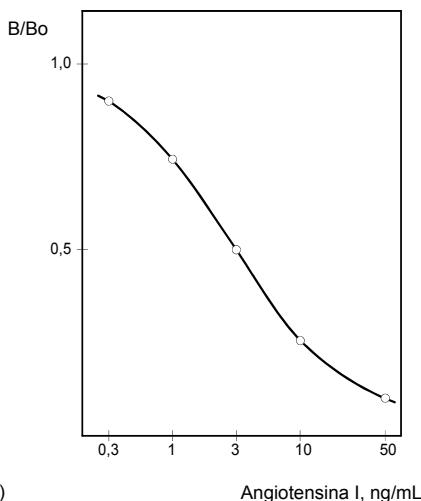


Fig. 2

Esempio di calcolo

I dati seguenti devono essere considerati solo un esempio e non devono essere usati in luogo dei dati ottenuti dall'utilizzatore.

Descrizione	cpm	B/Bo x 100
Calibratore zero	19.230	100
0,3 ng/mL	17.692	92,0
1 ng/mL	14.519	75,5
3 ng/mL	9.807	51,0
10 ng/mL	5.000	26,0
50 ng/mL	2.115	11,0
Bianco campione	17.499	91,0
Campione	9.038	47,0

Interpolando dalla curva di taratura e applicando la formula (1), il campione risulta avere un'attività reninica (PRA) di 2,39 ng/mL/ora.

$$PRA = \frac{(3,5 - 0,3) \times 1,12}{1,5} = 2,39 \text{ ng/mL/ora.}$$

8. DATI CLINICI

I valori riportati nella tabella seguente sono solamente indicativi per un apporto sodico di 100-150 mEq/24 ore. Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire i propri intervalli di riferimento.

Generazione a pH 6,0 PRA, ng/mL/ora	Posizione supina	Posizione eretta
	0,2 - 2,8	1,5 - 5,7

9. PRESTAZIONI METODOLOGICHE DEL KIT

9.1. Specificità analitica

La specificità analitica è definita come la capacità del test di rilevare esattamente l'analita in presenza di fattori potenzialmente interferenti nella matrice del campione (per esempio, emolisi, effetti di trattamenti del campione) o di reazioni crociate con analiti potenzialmente interferenti.

Poiché in questo caso particolare la quantità di sostanza da dosare è generata in vitro ed il bianco del campione viene sottratto, la reale specificità dell'anticorpo anti-angiotensina I non è critica.

Comunque, piuttosto che le interferenze con peptidi circolanti angiotensino-simili, sono le interferenze delle proteine del campione (bianco del campione) a limitare la sensibilità del dosaggio. Il bianco del campione include gli apporti di proteine angiotensino-simili e dell'angiotensina I circolante e prodotta dall'azione della renina anche a basse temperature dal momento del prelievo del sangue al momento del dosaggio.

Interferenze. Studi controllati su fattori potenzialmente interferenti hanno dimostrato che le prestazioni del test non sono influenzate da lipemia (fino a 500 mg/dL di trigliceridi), bilirubinemia (fino a 20 mg/dL di bilirubina). I valori di angiotensina I ottenuti con campioni contenenti 1000 mg/dL di emoglobina risultano circa del 10% inferiori a quelli ottenuti con campioni normali.

Reazioni crociate. Le percentuali di reazioni crociate di alcuni peptidi angiotensino-simili calcolate secondo Abraham, mostrano la specificità dell'anticorpo usato.

- Angiotensina I 100%
- Angiotensina II < 0,1%
- Eptapeptide, esapeptide << 0,02%

9.2. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica può essere espressa anche come limite di rilevazione, ossia la quantità minima di analita rilevabile dal test. Il limite di rilevazione è 0,20 ng/mL al 95% di confidenza. È stato calcolato come la concentrazione apparente di analita distinguibile dal calibratore zero, ossia due deviazioni standard sotto lo zero.

9.3. Precisione

La ripetibilità e la riproducibilità del saggio (ossia la variabilità intra-saggio e inter-saggio) sono state determinate utilizzando dei campioni di riferimento a diversi livelli di PRA.

Ripetibilità	A	B	C
Numero di determinazioni	10	10	10
Media (ng/mL/ora)	2,3	8,8	13,5
Deviazione standard	0,17	0,48	1,34
Coefficiente di variazione (%)	7,5	5,4	9,9

Riproducibilità	A	B	C
Numero di determinazioni	10	10	10
Media (ng/mL/ora)	2,6	8,6	13,0
Deviazione standard	0,20	0,70	1,50
Coefficiente di variazione (%)	7,7	8,1	11,5

9.4. Esattezza

L'esattezza del dosaggio è stata controllata mediante test di diluizione e di recupero.

Test di diluizione. Sono state dosate diluizioni scalari di due campioni di plasma a concentrazione elevata di angiotensina I effettuate nel calibratore zero.

Diluizione	Concentrazione attesa, ng/mL	Concentrazione misurata, ng/mL	% Recupero
in toto	–	17,5	–
1:2	8,75	8,6	98,3
1:4	4,38	4,5	102,9
1:8	2,19	2,3	105,1
1:16	1,09	1,1	100,6
in toto	–	8,5	–
1:2	4,25	4,4	103,5
1:4	2,13	2,2	103,5
1:8	1,06	1,1	103,5
1:16	0,53	0,5	94,1

Test di recupero. Sono stati dosati due campioni di plasma a bassa concentrazione di angiotensina I sia in toto sia dopo averli addizionati con quantità crescenti di angiotensina I.

Concentrazione addizionata, ng/mL	Concentrazione attesa, ng/mL	Concentrazione misurata, ng/mL	% Recupero
–	–	11,2	–
1,5	7,1	7,0	98,6
5,0	10,6	10,7	100,9
25,0	30,6	30,0	98,0
–	–	15,6	–
1,5	9,3	9,1	97,8
5,0	12,8	12,2	95,3
25,0	32,8	30,7	93,6

10. LIMITI DEL DOSAGGIO

Il significato clinico della determinazione dell'attività reninica plasmatica può essere invalidato se eseguito su pazienti non tenuti in condizioni controllate di postura, di apporto di sodio e potassio, o ai quali sono stati somministrati medicinali come diuretici, clonidina, agenti beta-bloccanti, estroprogestinici, vasodilatatori periferici, che alterano la secrezione reninica.

La diagnosi non deve essere formulata sulla base del risultato di un singolo dosaggio, ma questo deve essere valutato insieme ad altri riscontri clinici, procedure diagnostiche e al giudizio del medico.

Contaminazione batterica o cicli ripetuti di congelamento/scongelo dei campioni possono modificare i risultati del dosaggio.

Per ottenere risultati affidabili è necessario attenersi strettamente alle istruzioni per l'uso e possedere una adeguata manualità tecnica. In particolare è essenziale una buona precisione nelle fasi di ricostituzione e distribuzione dei reattivi e in quelle di aspirazione.

Risultati non riproducibili sono dovuti principalmente a fattori metodologici, come ad esempio:

- scambio di capsule tra i flaconi
- uso dello stesso puntale per i prelievi da flaconi diversi o da campioni diversi
- flaconi lasciati aperti per lunghi periodi di tempo
- esposizione dei reattivi o campioni a calore intenso o a forti sorgenti di inquinamento batterico
- aspirazione non adeguata della miscela di incubazione
- contaminazione del bordo delle provette con il tracciante o con i campioni
- oscillazioni casuali o cattiva manutenzione del contatore gamma
- scambio di reattivi provenienti da lotti diversi.

11. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I componenti del kit contengono sodio azide come conservante. Poiché la sodio azide può formare azidi di piombo o di rame esplosive nelle tubature, si raccomanda di far fluire acqua in abbondanza negli scarichi dopo l'eliminazione di soluzioni contenenti sodio azide (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Nocivo per ingestione.

R 31 – A contatto con acidi libera gas tossico.

S 28 – In caso di contatto con la pelle lavarsi immediatamente ed abbondantemente con acqua.

S 45 – In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

PMSF (Council Directive 99/45/EC):

R 22 – Nocivo per ingestione.

R 36/38 – Irritante per gli occhi e la pelle.

S 45 – In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

Etanolo (Council Directive 99/45/EC):

R 11 – Facilmente infiammabile.

S 7 – Conservare il recipiente ben chiuso.

S 16 – Conservare lontano da fiamme e scintille. Non fumare.

Tutte le unità di siero e plasma utilizzate per la fabbricazione dei componenti di questo kit sono state analizzate e trovate non reattive per HBsAg, anti-HCV e per anti-HIV-1/2. Tuttavia, poiché nessun metodo può dare assoluta certezza che siano assenti agenti patogeni, tutto il materiale di origine umana dovrebbe essere considerato potenzialmente infettivo e manipolato come tale.

12. REGOLE DI SICUREZZA

- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici durante l'esecuzione del dosaggio.
- Non pipettare con la bocca.
- Evitare il contatto diretto con il materiale potenzialmente infetto indossando indumenti da laboratorio, occhiali protettivi e guanti monouso. Lavare accuratamente le mani al termine del dosaggio.
- Evitare di provocare schizzi o aerosol. Ogni goccia di reattivo biologico deve essere rimossa con una soluzione di sodio ipoclorito al 5% ed il mezzo utilizzato deve essere trattato come materiale di rifiuto infetto.
- Tutti i campioni, tutti i reattivi biologici del kit e tutti i materiali usati per effettuare il saggio devono essere considerati in grado di trasmettere agenti infettivi; pertanto i rifiuti devono essere smaltiti secondo le disposizioni legislative e la regolamentazione vigente in ciascun Paese. Il materiale monouso deve essere incenerito; i rifiuti liquidi devono essere decontaminati con sodio ipoclorito ad una concentrazione finale del 5% per almeno mezz'ora. Qualsiasi materiale che deve essere riutilizzato va trattato in autoclave con un approccio di *overkill* (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente si considera che un'ora a 121°C sia un tempo di sterilizzazione adeguato; tuttavia si raccomanda a ciascun utilizzatore di verificare l'efficacia del ciclo di decontaminazione mediante una convalida iniziale e l'uso routinario di indicatori biologici.

13. REGOLE DI BASE DI RADIOPROTEZIONE

Reagenti contenenti iodio-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 2,1 μCi (76 kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

ATTENZIONE: La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

SCHEMA DEL DOSAGGIO

- 1- RICOSTITUIRE I REATTIVI.
- 2- ESEGUIRE LA GENERAZIONE DI ANGIOTENSINA I PER 90 MIN A 37°C IN PROVETTE NON SENSIBILIZZATE.
- 3- CONTRASSEGNARE LE PROVETTE SENSIBILIZZATE IN DUPLICATO PER IL DOSAGGIO RIA.
- 4- DISTRIBUIRE I REATTIVI SECONDO LO SCHEMA SEGUENTE ED AGITARE LA MISCELA DI INCUBAZIONE:

REATTIVI \ PROVETTE	CAL 0-5	CAMPIONI E BIANCHI
CALIBRATORI	50 μL	–
CAMPIONI	–	50 μL
TRACCIANTE	500 μL	500 μL

- 5- INCUBARE DA 3 A 24 ORE A TEMPERATURA AMBIENTE.
- 6- ASPIRARE ACCURATAMENTE LA MISCELA DI INCUBAZIONE.
- 7- MISURARE LA RADIOATTIVITÀ DELLE PROVETTE.

TROUSSE POUR LE DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'ANGIOTENSINE I

Technique de mesure de l'activité rénine plasmatique (PRA) au moyen du dosage quantitatif de l'angiotensine I dans le plasma humain

Usage in vitro

1. INTRODUCTION

La rénine est un enzyme protéolytique, d'un poids moléculaire d'environ 40.000 daltons, sécrété par les cellules glomérulaires rénales. Cet enzyme clive son substrat, l'angiotensinogène, et forme un décapeptide, l'angiotensine I, d'un poids moléculaire d'environ 1.300 daltons. Ce polypeptide est par la suite hydrolysé par l'enzyme de conversion (ACE) et l'on obtient un octapeptide biologiquement actif, l'angiotensine II. Le produit hormonal du système rénine-angiotensine, l'angiotensine II, possède une demi-vie biologique extrêmement courte, mais c'est l'agent vaso-constricteur le plus puissant actuellement connu. Ses effets sont importants dans la vaso-constriction, la stimulation du système nerveux sympathique et la stimulation de la sécrétion d'aldostérone par la corticosurrénale.

Etant donné que les niveaux d'angiotensine I représentent directement l'activité rénine plasmatique, la mesure de cette activité a été largement adoptée pour évaluer le système rénine-angiotensine dans des conditions pathologiques. L'évaluation de l'activité rénine plasmatique (PRA) chez les sujets hypertendus constitue une aide précieuse au diagnostic différentiel de l'aldostéronisme primaire et secondaire.

Divers facteurs agissent sur la sécrétion de la rénine, qui est inhibée par les niveaux plasmatiques d'angiotensine II et d'ADH, par une rétention du sodium et du potassium plus élevée et par une augmentation de la pression de perfusion du rein. Par contre, une perte de sodium et de potassium, une diminution de la pression de perfusion rénale ainsi que l'activité du système nerveux sympathique entraînent une sécrétion de rénine plus importante.

2. PRINCIPE DU DOSAGE

La mesure de l'activité rénine est basée sur le dosage radioimmunologique de l'angiotensine I. Le procédé comprend deux phases essentielles:

- la production d'angiotensine I dans des échantillons de plasma par incubation à 37°C, effectuée dans des conditions propres à prévenir la rupture enzymatique de l'angiotensine I (présence de l'inhibiteur enzymatique PMSF) et dans celles considérées comme les plus indiquées pour l'activité rénine
- le dosage radioimmunologique de l'angiotensine I dans des tubes revêtus et sur deux parties aliquotes provenant du même échantillon, une incubée à 37°C pour la production d'angiotensine I et l'autre non incubée (échantillon blanc).

Le principe du dosage radioimmunologique repose sur la compétition entre, d'une part, l'angiotensine I marquée et, de l'autre, l'angiotensine I contenue dans les étalons ou les échantillons, vis-à-vis des sites d'anticorps, en nombre limité et fixe. Après l'incubation RIA, la quantité d'angiotensine I marquée liée à l'anticorps fixé aux tubes revêtus est inversement proportionnelle à la concentration d'angiotensine I non marquée présente dans les étalons ou les échantillons. Le moyen de séparation lié/libre est basé sur l'emploi de tubes revêtus sur les parois desquels l'anticorps est fixé.

3. REACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Tubes revêtus	100
Angiotensine I marquée à I ¹²⁵ I	2 flacons
Étalons angiotensine I	6 flacons
Plasma de contrôle	1 flacon
Tampon de production	1 flacon
Inhibiteur enzymatique (PMSF)	1 flacon
Nombre de dosages	100

STOCKAGE: Conserver la trousse à 2-8°C dès réception. Ne pas congeler. Après l'ouverture, les réactifs de cette trousse restent stables jusqu'à la date de péremption de la trousse, s'ils sont conservés de manière adéquate. La trousse est garantie pour réaliser 3 séries analytiques si les réactifs sont utilisés d'après les recommandations du fabricant.

Ne pas utiliser les réactifs ayant dépassé la date de péremption. La date de péremption de la trousse est indiquée sur l'étiquette extérieure et correspond à la date de péremption du traceur. La date de péremption de chaque composant est reportée sur les étiquettes des flacons respectifs.

Agiter doucement les flacons lors de la reconstitution de leur contenu, afin d'éviter la formation de mousse. Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.

3.1. Tubes revêtus

La surface interne de chaque tube est revêtue d'IgG de lapin anti-angiotensine I biotinylées.

Au moment de l'emploi, amener les tubes revêtus à température ambiante avant d'ouvrir leur boîte, afin d'éviter tout phénomène de condensation.

Conserver les tubes non utilisés dans la boîte en s'assurant que celle-ci est dûment fermée. Ne pas mélanger des tubes revêtus provenant de lots différents.

3.2. Ilev-5-angiotensine I marquée à I¹²⁵I (rouge): réactif lyophilisé

Chaque flacon contient de l'hormone marquée à I¹²⁵I, de la sérumalbumine bovine, du tampon phosphaté, des stabilisants, des conservateurs et un colorant rouge inerte. La radioactivité maximale est de 81 kBq (2,2 µCi) par flacon à la date d'étalonnage.

Reconstituer le contenu de chaque flacon avec 26 mL d'eau distillée. Congeler la solution ainsi obtenue divisée en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses.

3.3. Etalons ilev-5-angiotensine I: réactif lyophilisé

Chaque flacon contient des quantités croissantes d'angiotensine I, de la sérumalbumine bovine, du tampon phosphaté et des conservateurs.

Reconstituer le contenu de chaque flacon avec 1 mL d'eau distillée. Les concentrations ainsi obtenues sont les suivantes: 0 - 0,3 - 1 - 3 - 10 - 50 ng/mL. Congeler les solutions divisées en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses. *Les étalons de la trousse sont commutables avec les échantillons examinés s'ils sont utilisés avec les réactifs et le mode opératoire de ce test diagnostique in vitro, d'après les recommandations du fabricant.*

3.4. Plasma de contrôle: réactif lyophilisé

Le flacon contient du plasma humain et des conservateurs. La plage de concentrations pour chaque contrôle est indiquée dans le certificat d'analyse et indique les limites établies par DiaSorin pour les valeurs de contrôle qui peuvent être obtenues dans des séries analytiques fiables.

Reconstituer le contenu du flacon avec 2 mL d'eau distillée froide en faisant en sorte que la température ne dépasse pas 4°C. Congeler la solution ainsi obtenue divisée en parties aliquotes à -20°C ou à des températures plus basses. Le plasma de contrôle doit être considéré comme un échantillon et l'angiotensine I produite pendant 90 min à 37°C avant le dosage.

3.5. Tampon de production (bleu): réactif prêt à l'emploi

Le flacon contient 4 mL de solution de tampon citraté, des stabilisants, des conservateurs et un colorant bleu inerte.

3.6. Inhibiteur enzymatique (PMSF): réactif prêt à l'emploi

Le flacon contient 1,0 mL de solution éthanolique (R 11, S 7, S 16) de fluorure de phénylméthylsulphonyle (PMSF) à 5% (R 23/24/25, S 36, S 45).

Si à 2-8°C le produit a tendance à cristalliser, le réchauffer à 37°C.

4. PRECAUTIONS D'UTILISATION

Certains réactifs contenus dans cette trousse renferment de l'azide de sodium. Ce sel peut réagir avec les installations sanitaires en plomb ou cuivre et former des azides métalliques extrêmement explosives. Pour évacuer ces réactifs, rincer à grande eau afin d'éviter les accumulations d'azide (Council Directive 99/45/EC).

R 22 - Nocif en cas d'ingestion.

R 31 - Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique.

S 28 - Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.

S 45 - En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

PMSF (Council Directive 99/45/EC):

R 22 - Nocif en cas d'ingestion.

R 36/38 - Irritant pour les yeux et la peau.

S 45 - En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

Ethanol (Council Directive 99/45/EC):

R 11 - Facilement inflammable.

S 7 - Conserver le récipient bien fermé.

S 16 - Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles. Ne pas fumer.

Toutes les unités de sérum et de plasma utilisées pour la fabrication des composants de cette trousse ont été analysées et ont été trouvées négatives en Ag HBs, en anticorps anti-VHC et en anticorps anti-HIV-1/2. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux. C'est pourquoi il faudra le manipuler avec précaution.

5. REGLES DE SECURITE

- Ne pas manger, ni boire, ni fumer ou se maquiller pendant le dosage.
- Ne pas pipeter avec la bouche.
- Eviter le contact direct avec le matériel potentiellement infectieux en portant des vêtements de laboratoire, des lunettes de protection et des gants à usage unique. Se laver soigneusement les mains à la fin du dosage.
- Eviter de provoquer des éclaboussures ou des vaporisations. Si cela arrivait, chaque goutte de réactif doit être nettoyée avec une solution d'hypochlorite de sodium à 5% et traitée comme du matériel infectieux.
- Tous les échantillons, tous les réactifs biologiques de la trousse et tout le matériel utilisés pour effectuer l'essai doivent être considérés comme capables de transmettre des agents étiologiques. Toute élimination de déchets se fera conformément aux réglementations en vigueur. Le matériel à usage unique doit être incinéré; les déchets liquides doivent être décontaminés avec de l'hypochlorite de sodium à concentration finale de 5% pendant au moins une demi-heure. Tout matériel réutilisable doit être stérilisé en autoclave par un traitement à l'excès (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). On considère qu'un temps de stérilisation d'une heure à 121°C est convenable. Nous conseillons toutefois à chaque laboratoire de vérifier l'efficacité du cycle de décontamination en effectuant un contrôle au début et en utilisant de façon régulière les indicateurs biologiques.

6. REGLES DE BASE DE RADIOPROTECTION

Réactifs contenant de l'Iode 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 2,1 µCi (76 kBq) d'iode-125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, de laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article de verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles de verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

ATTENTION : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radio-activité théorique de la trousse.

Déchets radioactifs

Tout utilisateur ou détenteur de radioéléments en sources scellées ou non scellées en est responsable et comptable devant les autorités de Santé Publique et, de ce fait, n'est pas autorisé à s'en dessaisir par d'autres voies que celles définies par les procédures réglementaires. Les modalités d'élimination des déchets radioactifs provenant de sources non scellées sont définies par l'avis aux utilisateurs paru au Journal Officiel du 6 juin 1970. Conformément aux dispositions de cet avis et du décret N° 86-1103 du 2 octobre 1986 relatif à la protection des travailleurs contre les dangers des rayonnements ionisants paru au Journal Officiel du 12 octobre 1986, l'OPR⁽¹⁾ et les organismes désignés par lui sont seuls habilités à procéder à la prise en charge des déchets radioactifs correspondants. Les laboratoires de notre filiale en France sont autorisés à céder les trousseaux conformément aux instructions de l'Arrêté du 3 avril 2002 et dans le respect de la réglementation sur le transport de matériel radioactif.

7. MATERIEL NECESSAIRE, MAIS NON FOURNI

- Eau distillée et déminéralisée.
- Béchers.
- Tubes en polystyrène à usage unique.
- Portoir pour tubes.
- Micropipettes avec embouts à usage unique de 10, 50 µL (justesse ± 3%, fidélité 2%) et 200, 500 µL (justesse ± 2%, fidélité 1%).
- Mélangeur Vortex.
- Bain-marie capable de maintenir 37° ± 1°C.
- Système d'aspiration du mélange d'incubation.
- Compteur gamma pour compter l'iode ¹²⁵I (définition de la fenêtre du compteur: 15-80 keV - efficacité du compteur: 70% - temps de comptage: 1 min). Si l'efficacité du compteur est inférieure à 60%, le temps de comptage doit être prolongé à 2 min.

8. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Prélèvement des échantillons

Il est fortement conseillé de standardiser scrupuleusement la préparation du patient et les conditions de prélèvement de l'échantillon. Le sang doit être recueilli dans des tubes pré-réfrigérés contenant l'anticoagulant EDTA sodique.

Lors du prélèvement des échantillons de sang, ne pas utiliser l'héparine comme substance anticoagulante car celle-ci interfère avec la production d'angiotensine I. En revanche, l'EDTA offre l'avantage d'être un anticoagulant efficace et de contribuer à l'inhibition de l'enzyme de conversion.

⁽¹⁾O.P.R.I. BP 35 - 78110 Le Vésinet.

Les échantillons doivent être conservés à 2-8°C puis centrifugés à froid à 2000 min pour séparer le plasma. Clarifier par filtration ou centrifugation avant le test les échantillons troubles, lipémiques et ceux contenant du matériel en suspension ou des déchets érythrocytaires. Ne pas utiliser des échantillons fortement hémolysés ou lipémiques, ni des échantillons contenant des particules en suspension ou une contamination microbienne évidente. Si le dosage n'est pas exécuté immédiatement, les échantillons doivent être divisés en parties aliquotes et congelés à -20°C ou à des températures plus basses en attendant qu'ils soient dosés. Si les échantillons ont été congelés, attendre qu'ils soient complètement décongelés et les homogénéiser avant le dosage en faisant en sorte que la température ne dépasse pas 4°C. Il faut éviter les cycles de congélation/décongélation répétés.

Production d'angiotensine I

La production d'angiotensine I à pH 6,0 se déroule dans des conditions optimales, ce qui entraîne une meilleure sensibilité sur les échantillons ayant une activité rénine faible, et permet également d'appliquer des temps de production plus courts. Les conditions de production choisies permettent de travailler avec l'échantillon le moins dilué possible et donc de réduire l'effet de la dilution sur la cinétique de production de l'angiotensine I.

- Ajouter les réactifs dans des tubes de production **non revêtus**, placés dans un bain de glace **en respectant strictement cet ordre**:
 - . 500 µL d'échantillon
 - . 10 µL de PMSF
 - . 50 µL de tampon de production.
- Agiter le contenu des tubes au Vortex et transférer 200 µL de chaque échantillon dans une seconde série de tubes non revêtus.
- Incuber la deuxième série de tubes dans un bain-marie à 37°C pendant 90 min et conserver la première série de tubes dans un bain de glace (échantillons blancs).

Le temps de production suggéré correspond à une valeur moyenne qui permet la détermination de l'activité rénine plasmatique dans la plupart des conditions physiopathologiques. Si l'on envisage de trouver des valeurs plus élevées ou plus basses que celles prévues, le temps de production peut être respectivement réduit ou augmenté dans la mesure où la quantité d'angiotensine I produite est une fonction linéaire du temps (Fig. 1).

- Après l'incubation à 37°C, les tubes de production doivent être immédiatement plongés dans un bain de glace.

9. MODE OPERATOIRE

La distribution des réactifs doit être effectuée à température ambiante (20-25°C). Effectuer le dosage au moins en doublets. Les étalons doivent être essayés directement dans le dosage RIA avec des tubes revêtus sans effectuer auparavant la production d'angiotensine I et doivent être dosés avec chaque série d'échantillons examinés. Le mode opératoire doit être rigoureusement identique pour les étalons et les échantillons à tester.

Exécuter toutes les phases du dosage dans l'ordre prévu, sans interruption.

Utiliser un embout à usage unique neuf pour distribuer les étalons et les échantillons.

- Distribuer les réactifs *au fond des tubes revêtus*. Procéder d'après le schéma suivant:

réactifs	tubes	Etalons 0-5	Echantillons et échantillons blancs
Etalons		50 µL	-
Echantillons		-	50 µL
Traceur		500 µL	500 µL

- **Agiter** le contenu des tubes au Vortex puis **incuber de 3 à 24 heures à température ambiante**.
- **Aspirer** soigneusement le mélange d'incubation. *Vérifier que le liquide soit éliminé complètement: pour cela il faut s'assurer que l'embout de la pipette d'aspiration touche le fond des tubes revêtus. La présence de gouttes adhérant aux parois des tubes revêtus peut entraîner une mauvaise reproductibilité ou fausser les résultats. Le colorant doit disparaître totalement.*
- **Mesurer la radioactivité** des tubes.

10. CALCUL DES RESULTATS

Calculer la moyenne des coups par minute pour chaque groupe de tubes après avoir soustrait la valeur du bruit de fond. Calculer la moyenne des coups par minute des étalons et des échantillons en pourcentage par rapport à l'étalon zéro:

$$B/B_0\% = \frac{\text{moyenne des coups par minute des étalons ou des échantillons}}{\text{moyenne des coups par minute de l'étalon zéro}} \times 100$$

Reporter sur du papier semi-logarithmique le pourcentage moyen calculé pour chaque étalon sur l'axe des ordonnées (y) en fonction de la concentration d'angiotensine I exprimée en ng/mL sur l'axe des abscisses (x). La Fig. 2 présente un exemple de la courbe d'étalonnage ainsi obtenue.

L'activité rénine plasmatique (PRA) est calculée en ng d'angiotensine I produits par mL par heure selon le procédé indiqué:

- lire directement de la courbe d'étalonnage la concentration d'angiotensine I produite pour chaque échantillon incubé à 37°C et pour l'échantillon blanc respectif (conservé dans un bain de glace)
- soustraire à la valeur de chaque échantillon la valeur de l'échantillon blanc correspondant
- multiplier la valeur obtenue par 1,12 car la dilution de base de l'échantillon a été de 1,12
- diviser les niveaux obtenus par le temps de production exprimé en heures:

$$\text{PRA} = \frac{(\text{ng } 37^{\circ}\text{C} - \text{ng } 4^{\circ}\text{C}) \times 1,12}{\text{heures d'incubation}} = \text{ng/mL/heure.} \quad (1)$$

Pour un temps de production d'une heure et demie, la formule (1) peut être simplifiée comme suit:

$$\text{PRA} = (\text{ng } 37^{\circ}\text{C} - \text{ng } 4^{\circ}\text{C}) \times 0,747 = \text{ng/mL/heure.}$$

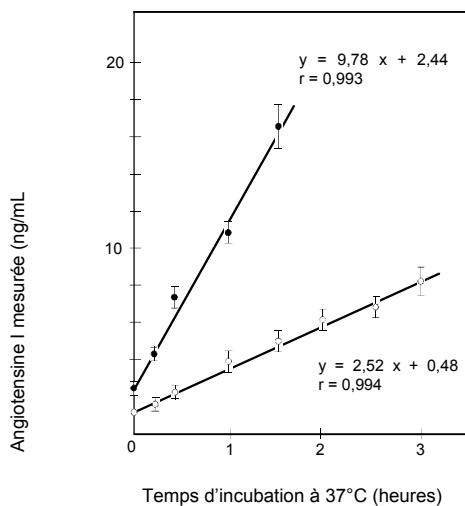


Fig. 1 - Contrôle de la linéarité de la production d'angiotensine I en augmentant le temps d'incubation à 37°C, pH 6,0.

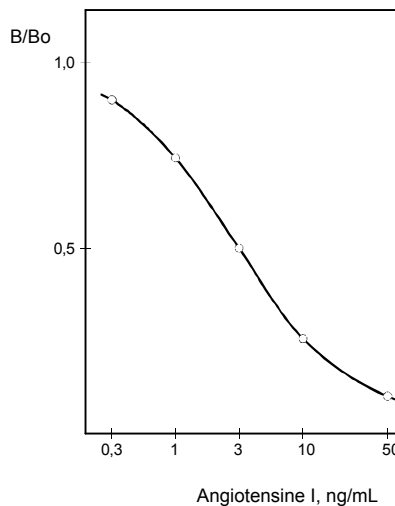


Fig. 2

Exemple de calcul

Les valeurs suivantes ne constituent qu'un exemple et ne doivent pas être employées à la place des données obtenues par l'utilisateur.

Description	cpm	B/Bo x 100
Étalon zéro	19.230	100
0,3 ng/mL	17.692	92,0
1 ng/mL	14.519	75,5
3 ng/mL	9.807	51,0
10 ng/mL	5.000	26,0
50 ng/mL	2.115	11,0
Echantillon blanc	17.499	91,0
Echantillon	9.038	47,0

En effectuant l'interpolation de la courbe d'étalonnage, et en appliquant la formule (1), l'échantillon a une activité rénine (PRA) de 2,39 ng/mL/heure.

$$\text{PRA} = \frac{(3,5 - 0,3) \times 1,12}{1,5} = 2,39 \text{ ng/mL/heure.}$$

11. VALEURS DE REFERENCE

Les valeurs du tableau ci-dessous ne sont données qu'à titre indicatif pour un apport de sodium de 100-150 mEq/24 heures. Chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles des valeurs de référence.

Production à pH 6,0 PRA, ng/mL/heure	Position sur le dos	Position debout
	0,2 - 2,8	1,5 - 5,7

12. CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

12.1. Spécificité analytique

La spécificité analytique est définie comme la capacité du test à détecter exactement l'analyte en présence de facteurs pouvant interférer dans la matrice de l'échantillon (par exemple hémolyse, effets de traitement de l'échantillon) ou d'autres analytes pouvant provoquer des réactions croisées.

Puisque, dans ce cas particulier, la quantité de substance à doser est produite in vitro et que l'échantillon blanc est soustrait, la spécificité réelle de l'anticorps anti-angiotensine I n'est pas décisive.

Cependant, ce sont plutôt les interférences des protéines de l'échantillon (échantillon blanc) qui limitent la sensibilité du dosage et non les réactions croisées avec les peptides circulants, chimiquement très proches de l'angiotensine. L'échantillon blanc contient les apports de protéines chimiquement très proches de l'angiotensine ainsi que de l'angiotensine I circulante et produite sous l'action de la rénine même à de basses températures, depuis le prélèvement du sang jusqu'au dosage.

Interférences. Des études contrôlées sur des facteurs potentiellement interférents ont démontré que les caractéristiques du test ne sont pas modifiées par une lipémie (jusqu'à 500 mg/dL de triglycérides), une bilirubinémie (jusqu'à 20 mg/dL de bilirubine) ou une congélation des échantillons. Les valeurs d'angiotensine I obtenues avec des échantillons contenant 1000 mg/dL d'hémoglobine sont inférieures d'environ 10% aux valeurs obtenues avec des échantillons normaux.

Réactions croisées. Les pourcentages de réactions croisées de certains peptides proches de l'angiotensine, calculés selon la méthode d'Abraham, montrent la spécificité de l'anticorps utilisé dans cette trousse.

- Angiotensine I 100%
- Angiotensine II < 0,1%
- Heptapeptide, hexapeptide << 0,02%

12.2. Sensibilité analytique

La sensibilité analytique peut être exprimée aussi comme la limite de détection, c'est-à-dire la quantité d'analyte minimum que le test peut détecter. La limite de détection est de 0,20 ng/mL avec des limites de confiance à 95%, calculée comme étant la concentration apparente d'analyte qui peut être différenciée de l'étalon zéro, c'est-à-dire deux écarts type au-dessous de zéro.

12.3. Fidélité

Plusieurs pools de référence à différentes valeurs de PRA ont été testés pour déterminer la répétabilité et la reproductibilité du dosage (c'est-à-dire, la variabilité intra-essai et inter-essais).

Répétabilité	A	B	C
Nombre de déterminations	10	10	10
Moyenne (ng/mL/heure)	2,3	8,8	13,5
Ecart type	0,17	0,48	1,34
% de coefficient de variation	7,5	5,4	9,9
Reproductibilité	A	B	C
Nombre de déterminations	10	10	10
Moyenne (ng/mL/heure)	2,6	8,6	13,0
Ecart type	0,20	0,70	1,50
% de coefficient de variation	7,7	8,1	11,5

12.4. Justesse

La justesse du dosage a été vérifiée à l'aide des tests de dilution et de surcharge.

Test de dilution. Le test de dilution a été réalisé sur deux échantillons de plasma de concentration élevée en angiotensine I dilués en série à l'aide de l'étalon zéro.

Dilution	Concentration attendue, ng/mL	Concentration mesurée, ng/mL	% Récupération
pur	–	17,5	–
1/2	8,75	8,6	98,3
1/4	4,38	4,5	102,9
1/8	2,19	2,3	105,1
1/16	1,09	1,1	100,6
pur	–	8,5	–
1/2	4,25	4,4	103,5
1/4	2,13	2,2	103,5
1/8	1,06	1,1	103,5
1/16	0,53	0,5	94,1

Test de surcharge. Le test de surcharge a été réalisé sur deux échantillons de plasma de faible concentration en angiotensine I soit purs soit par ajouts de quantités croissantes d'angiotensine I.

Concentration ajoutée, ng/mL	Concentration attendue, ng/mL	Concentration mesurée, ng/mL	% Récupération
–	–	11,2	–
1,5	7,1	7,0	98,6
5,0	10,6	10,7	100,9
25,0	30,6	30,0	98,0
–	–	15,6	–
1,5	9,3	9,1	97,8
5,0	12,8	12,2	95,3
25,0	32,8	30,7	93,6

13. LIMITES DU DOSAGE

La valeur clinique de la détermination de l'activité rénine plasmatique peut être invalidée si elle est effectuée chez des patients dont les conditions de posture, l'apport de sodium et de potassium ne sont pas contrôlés et respectés, ou bien en cas d'administration de médicaments tels que des diurétiques, la clonidine, les bêta-bloquants, les oestroprogestatifs, les vaso-dilatateurs périphériques altérant la sécrétion de la rénine.

Le diagnostic ne doit pas être établi d'après le résultat d'un seul dosage, mais il faut prendre en considération les investigations cliniques, les autres procédures diagnostiques et l'avis d'un médecin.

La contamination bactérienne des échantillons ou leurs cycles répétés de congélation/ décongélation peuvent modifier les résultats du dosage.

Afin d'obtenir des résultats fiables, il faut suivre strictement le mode opératoire et effectuer les manipulations de façon appropriée. En particulier, la précision et le soin apportés durant les phases de reconstitution et de distribution des réactifs ainsi que d'aspiration sont indispensables à la fiabilité du test.

Des résultats qui ne sont pas reproductibles sont dus principalement à des erreurs de manipulation comme par exemple:

- échange de bouchons entre les flacons
- utilisation du même embout pour prélever dans différents flacons ou distribuer les différents échantillons
- flacons restés trop longtemps ouverts
- exposition des réactifs ou des échantillons à une température élevée ou à de fortes sources de contamination bactérienne
- aspiration inadéquate du mélange d'incubation
- contamination du bord des tubes avec le traceur ou avec les échantillons
- oscillations accidentelles ou mauvais entretien du compteur gamma
- mélange de réactifs provenant de lots différents.

SCHÉMA DU DOSAGE

- 1 - RECONSTITUER LES RÉACTIFS.
- 2 - EFFECTUER LA PRODUCTION D'ANGIOTENSINE I PENDANT 90 MIN A 37°C DANS DES TUBES NON REVÊTUS.
- 3 - IDENTIFIER AU MOYEN D'UN REPERE LES TUBES REVÊTUS EN DOUBLETS POUR LE DOSAGE RIA.
- 4 - DISTRIBUER LES RÉACTIFS EN FONCTION DU SCHÉMA SUIVANT PUIS AGITER LE MÉLANGE D'INCUBATION:

RÉACTIFS \ TUBES	ÉTALONS 0-5	ÉCHANTILLONS, ÉCH. BLANCS
ÉTALONS	50 µL	-
ÉCHANTILLONS	-	50 µL
TRACEUR	500 µL	500 µL

- 5 - INCUBER DE 3 À 24 HEURES A TEMPÉRATURE AMBIANTE.
- 6 - ASPIRER SOIGNEUSEMENT LE MÉLANGE D'INCUBATION.
- 7 - MESURER LA RADIOACTIVITÉ DES TUBES.

ANGIOTENSIN I RIA

Methode zur Messung der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) durch quantitative radioimmunologische Angiotensin I-Bestimmung in Humanplasma

Nur für In-vitro-Diagnostik

1. EINLEITUNG

Renin ist ein proteolytisches Enzym mit einem Molekulargewicht von etwa 40.000 Daltons, das in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet wird. Durch seine Wirkung entsteht aus Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I mit einem Molekulargewicht von etwa 1.300 Daltons. Angiotensin I wird durch Einwirkung des Converting Enzyms (ACE) in das biologisch aktive Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt.

Angiotensin II besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit, hat aber die stärkste uns bekannte vasopressorische Wirkung. Hauptwirkungen sind: Vasokonstriktion, Stimulation des sympathischen Nervensystems und Anregung der Aldosteronausscheidung.

Da jedoch die Angiotensin I-Konzentration in direkter Beziehung zur Plasma-Renin-Aktivität steht, hat die Plasma-Reninbestimmung bei der Bewertung des Renin-Angiotensin-Systems große Wichtigkeit erlangt. Die Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) bei Hochdruckpatienten ist von besonderer Wichtigkeit bei der Differentialdiagnostik von primärem und sekundärem Aldosteronismus.

Die Reninsekretion wird durch Angiotensin II und ADH, Natrium- und Kalium-Retention und erhöhten Niereninnendruck gehemmt. Natrium- und Kalium-Mangel, erniedrigter Niereninnendruck und Sympathikuseinflüsse steigern die Reninsekretion.

2. TESTPRINZIP

Die Renin-Aktivität wird mittels eines Angiotensin I-Radioimmunoassays ermittelt. Die wesentlichen Schritte der Testdurchführung sind:

- Bildung von Angiotensin I unter optimalen Bedingungen (Vorhandensein von PMSF-Enzymhemmer) während der ersten Inkubation bei 37°C.
- Angiotensin I-Radioimmunoassay (Coated Tubes) mit einem bei 37°C inkubierten und einem nichtinkubierten Ansatz als Probenleerwert.

Das Prinzip dieses Radioimmunoassays basiert auf der Konkurrenz zwischen markiertem Angiotensin I und Angiotensin I in den Kalibratoren oder Proben um eine begrenzte Zahl an die Röhrenwand gebundener Antikörperbindungsstellen. Nach der RIA-Inkubation ist die Menge des wandgebundenen markierten Angiotensins I umgekehrt proportional zur Konzentration des freien Angiotensins in den Kalibratoren oder Proben. Als Trennmethode wird die Coated Tube-Technik verwendet, bei der die Antikörper an der Röhreninnenfläche fixiert sind.

3. LIEFERUMFANG DES TESTS

Beschichtete Röhren	100
¹²⁵ J-markiertes Angiotensin I	2 Fläschchen
Angiotensin I-Kalibratoren	6 Fläschchen
Kontrollplasma	1 Fläschchen
Reaktionspuffer	1 Fläschchen
Enzymhemmer (PMSF)	1 Fläschchen
Anzahl der Bestimmungen	100

LAGERUNG: Die Testpackung bei 2-8°C lagern! Nicht einfrieren. Nach dem Öffnen sind alle Reagenzien des Kits bei entsprechender Lagerung bis zum Verfalldatum des Kits stabil. Der Kit wurde für die Durchführung von 3 analytischen Testserien entworfen, wenn die Reagenzien gemäß den Anweisungen des Herstellers aufbewahrt werden.

Die Reagenzien sind nicht nach dem Verfalldatum zu benutzen. Das Verfalldatum des Kits befindet sich auf der Verpackung und ist identisch mit dem Verfalldatum des Tracers. Die Verfalldaten der einzelnen Reagenzien sind jeweils auf den Flaschenetiketten angegeben.

Die Reagenzien unter Vermeidung von Schaum auflösen. Nie unterschiedliche Reagenzienchargen miteinander mischen!

3.1. Beschichtete Röhren

Die Innenfläche der Röhren ist mit biotinyliertem IgG (Kaninchen) gegen Angiotensin I-Konjugat beschichtet. Vor Gebrauch die Röhren in der ungeöffneten Dose auf Raumtemperatur bringen, um die Bildung von Kondenswasser auf der Oberfläche zu vermeiden.

Nichtgebrauchte Röhren in der Dose lagern. Die Dose gut verschließen. Nie verschiedene Chargen beschichteter Röhren miteinander mischen.

3.2. ¹²⁵J-markiertes Ileu-5-Angiotensin I (rot) (lyophilisiert)

Jedes Fläschchen enthält das mit ¹²⁵J markierte Hormon, Rinderserumalbumin, Phosphatpuffer, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die Radioaktivität beträgt max. 81 kBq (2,2 µCi) pro Fläschchen am Tag der Kalibration. Den Inhalt jedes Fläschchens in 26 mL Aqua dest. auflösen und portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter).

3.3. Ileu-5-Angiotensin I-Kalibratoren (lyophilisiert)

Die Fläschchen enthalten Rinderserumalbumin, Phosphatpuffer, Konservierungsmittel und Angiotensin I mit den folgenden Konzentrationen: 0 - 0,3 - 1 - 3 - 10 - 50 ng/mL. Den Inhalt der Fläschchen in 1 mL Aqua dest. auflösen und portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter). Die Kalibratoren des Kits sind mit den untersuchten Proben umschaltbar, wenn sie mit den Reagenzien und der Testdurchführung dieses In-vitro diagnostischen Tests verwendet werden, gemäß den Anweisungen des Herstellers.

3.4. Kontrollplasma (lyophilisiert)

Das Fläschchen enthält Humanplasma und Konservierungsmittel. Der Konzentrationsbereich jeder Kontrolle ist auf dem Analysenzertifikat angegeben; er gibt die Grenzen an, die von DiaSorin für Kontrollwerte festgelegt wurden, die in zuverlässigen Testdurchgängen erhalten werden können.

Den Inhalt des Fläschchens in 2 mL gekühltem Aqua dest. auflösen. Es ist darauf zu achten, dass die Temperatur von 4°C nicht überschritten wird. Zur Lagerung portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter). Das Kontrollplasma muss wie eine Probe behandelt werden und Angiotensin I muss vor der Bestimmung 90 Min. bei 37°C freigesetzt werden.

3.5. Reaktionspuffer (blau) (gebrauchsfertige Lösung)

Das Fläschchen enthält 4 mL Zitratpuffer-Lösung, Stabilisatoren, Konservierungsmittel und einen inerten blauen Farbstoff.

3.6. Enzymhemmer (PMSF) (gebrauchsfertige Lösung)

Das Fläschchen enthält 1,0 mL äthanolische (R 11, S 7, S 16) PhenylmethylsulfonylFluorid-5%-Lösung (PMSF) (R 23/24/25, S 36, S 45).

Tritt bei 2-8°C Kristallisierung auf, ist die Lösung auf 37°C zu erwärmen.

4. ERFORDERLICHE GERÄTE UND MATERIALIEN (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

- Aqua dest. und deionisiertes Wasser.
- Glasbehälter.
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch.
- Röhrchen-Ständer.
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 50, 200, 500 µL) (10, 50 µL: Richtigkeit ± 3%, Präzision 2%; 200, 500 µL: Richtigkeit ± 2%, Präzision 1%).
- Vortex-Mischer.
- Wasserbad mit Thermostat (37° ± 1°C).
- Absaugvorrichtung zum Absaugen der Inkubationsmischung.
- Gammacounter um das ¹²⁵J-Jod zu zählen (Anlegen der Counter-Öffnung: 15-80 keV - Counter-Leistungsfähigkeit: 70% - Zählungszeit: 1 Min.). Wenn die Counter-Leistungsfähigkeit kleiner als 60% ist, muss die Zählungszeit verlängert werden (2 Min.).

5. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Probengewinnung

Die Vorschriften zur Vorbereitung der Patienten und der Blutentnahme sollten genauestens eingehalten werden. Das Blut wird in vorgekühlten Röhrchen mit Natrium-EDTA als Antikoagulanzen gesammelt.

Heparin als Antikoagulanzen darf nicht benutzt werden, da es die Angiotensin-I-Erzeugung hemmt. EDTA hingegen ist auch wegen seiner unterstützenden Wirkung auf die Hemmung des Converting Enzyms sehr geeignet.

Zur Gewinnung des Plasmas müssen die Proben (bei ca. 2000 g) kalt zentrifugiert werden. Die Proben, die Teilchen in Suspension aufweisen, trüb oder lipämisch sind, oder Erythrozytenreste aufweisen, durch Filtern oder Zentrifugieren klären. Weder stark hämolytische oder lipämische Proben, noch Proben mit Teilchen in Suspension oder eindeutiger Mikrobenkontamination verwenden! Werden die Bestimmungen nicht sofort durchgeführt, können die Proben portioniert tiefgefroren werden (-20°C oder kälter). Sind die Proben aufgetaut worden, vor der Bestimmung vorsichtig schütteln. Beim Auftauen ist darauf zu achten, dass die Temperatur von 4°C nicht überschritten wird. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!

Angiotensin I-Erzeugung

Die Erzeugung von Angiotensin I wird bei pH 6,0 unter optimalen Bedingungen durchgeführt. Die Vorteile der Inkubation bei pH 6,0 sind eine bessere Empfindlichkeit für Proben mit niedriger Renin-Aktivität und die mögliche Reduzierung der Inkubationszeit. Diese ausgewählten Bedingungen erlauben es, mit minimaler Probenverdünnung zu arbeiten und somit den Verdünnungseffekt auf die Angiotensin I-Erzeugungskinetik zu reduzieren.

- Die folgenden Reagenzien in ein gekühltes **unbeschichtetes** Röhrchen bei **strengster Einhaltung der angegebenen Reihenfolge pipettieren**:
 - . 500 µL Probe
 - . 10 µL PMSF
 - . 50 µL Reaktionspuffer.
- Mit einem Vortex-Mischer mischen. Jede Probe wird in zwei 200 µL-Ansätze aufgeteilt. Die erste wird in ein Eisbad gestellt (Probenleerwert), während die zweite bei 37°C 90 Min. im Wasserbad inkubiert wird.

Die vorgeschlagene Angiotensin I-Erzeugungszeit ermöglicht die Messung der Plasma-Renin-Aktivität bei vielen pathologischen Zuständen. Sollten höhere oder niedrigere Werte erwartet werden, so ist die Erzeugungszeit entsprechend zu erniedrigen oder zu erhöhen (Abb. 1).
- Nach der 37°C-Inkubation müssen die Röhrchen sofort in ein Eisbad gestellt werden.

6. TESTDURCHFÜHRUNG

Den Test auf Raumtemperatur (20-25°C) in Doppelbestimmungen durchführen. Die Kalibratoren müssen direkt im Radioimmunoassay mit beschichteten Röhrchen getestet werden, ohne Angiotensin I zuerst freizusetzen. Die Bestimmung der Kalibratoren ist für jede Proben-Serie durchzuführen. Kalibratoren und Proben unter den gleichen Bedingungen testen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerungen zwischen den einzelnen Versuchsschritten durchführen. Für jede Pipettierung der Kalibratoren und der Proben saubere Einmalspitzen benutzen.

- Reagenzien *auf den Boden der beschichteten Röhrchen* pipettieren. Der Testverlauf erfolgt nach folgendem Schema:

	Röhrchen	Kalibratoren 0-5	Proben + Leerwerte
Reagenzien			
Kalibratoren		50 µL	–
Proben		–	50 µL
Tracer		500 µL	500 µL

- Den Inhalt der Röhrchen vorsichtig mit einem Vortex-Mischer **mischen** und **3-24 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren**.
- Inkubationsmischung vorsichtig **absaugen**. *Es ist zu überprüfen, ob die Flüssigkeit vollständig eliminiert ist, indem man sich versichert, dass die Absaug-Pipettenspitze den Boden der beschichteten Röhrchen berührt. Das Vorhandensein von Tröpfchen, die an die Wände der beschichteten Röhrchen heften, kann schwer reproduzierbare oder unglaubliche Ergebnisse verursachen. Kein Farbstoff soll sichtbar sein.*
- Die **Radioaktivität** der Röhrchen **messen**.

7. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die mittlere Nettozählrate von Proben und Kalibratoren ausrechnen. Den B/Bo%-Quotienten nach folgender Formel ausrechnen:

$$B/Bo\% = \frac{\text{Mittlere Zählrate von Proben oder Kalibratoren}}{\text{Mittlere Zählrate des Nullkalibrators}} \times 100$$

Auf halblogarithmischem Papier die mittlere Prozentwerte jedes Kalibrators auf der Ordinate (y-Achse) in Funktion zur Angiotensin I-Konzentration ausgedrückt in ng/mL auf der Abszisse (x-Achse) auftragen. Durch Verbinden der Punkte wird eine Kalibrationskurve erstellt (Abb. 2).

Um die Angiotensin I-Konzentrationen zu ermitteln, wird die Konzentration des entsprechenden im Eisbad aufbewahrten Probenleerwertes von jedem Wert der bei 37°C inkubierten Proben subtrahiert.

Da die Proben mit dem Reaktionspuffer 1:1,12 verdünnt wurden, werden die erreichten Angiotensin I-Konzentrationen mit dem Faktor 1,12 multipliziert.

Die Plasma-Renin-Aktivität wird als ng freigesetztes Angiotensin I/mL/Stunde berechnet.

$$PRA = \frac{(\text{ng } 37^\circ\text{C} - \text{ng } 4^\circ\text{C}) \times 1,12}{\text{Inkubationsstunden}} = \text{ng/mL/Stunde.} \quad (1)$$

Bei 1,5 Std. Angiotensin I-Erzeugungszeit vereinfacht sich die Formel (1) wie folgt:

$$PRA = (\text{ng } 37^\circ\text{C} - \text{ng } 4^\circ\text{C}) \times 0,747 = \text{ng/mL/Stunde.}$$

Den Angiotensin I-Wert jeder unbekannt Probe direkt aus der Kalibrationskurve ablesen.

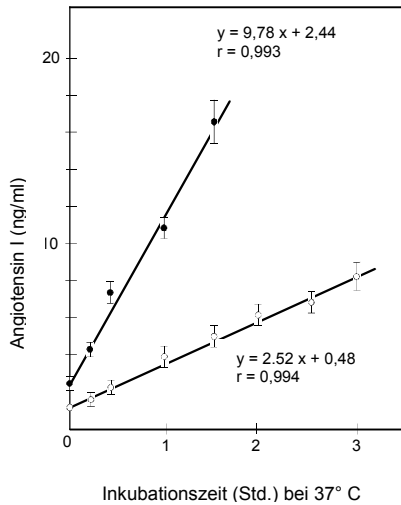


Abb. 1 - Überprüfung der Linearität der Angiotensinerzeugung in Abhängigkeit von der Zeit bei 37°C, pH 6,0.

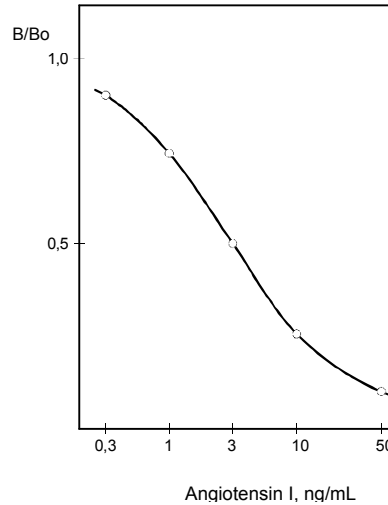


Abb. 2

Berechnungsbeispiel

Nachfolgende Daten gelten lediglich als Beispiel und dürfen nicht zur Ermittlung der tatsächlichen Ergebnisse benutzt werden.

Bezeichnung	cpm	B/Bo x 100
Nullkalibrator	19.230	100
0,3 ng/mL	17.692	92,0
1 ng/mL	14.519	75,5
3 ng/mL	9.807	51,0
10 ng/mL	5.000	26,0
50 ng/mL	2.115	11,0
Probenleerwert	17.499	91,0
Probe	9.038	47,0

Durch Ablesen von der Kalibrationskurve wird für die bei 37°C inkubierte Probe eine Konzentration von 3,5 ng/mL ermittelt; der dazugehörige Leerwert beträgt 0,3 ng/mL. Da die Inkubationszeit 1,5 Stunden betrug, stellt sich die Berechnungsformel der PRA folgendermaßen dar (1):

$$PRA = \frac{(3,5 - 0,3) \times 1,12}{1,5} = 2,39 \text{ ng/mL/Stunde.}$$

8. ERWARTETE WERTE

Die nachfolgenden Werte sind lediglich als Anhaltswerte bei einer Natrium-Aufnahme von 100-150 mEq/24 Stunden zu verstehen; jedes Labor sollte eigene Referenzbereiche ermitteln.

Erzeugung bei pH 6,0 PRA, ng/mL/Stunde	Liegend	Stehend
	0,2 - 2,8	1,5 - 5,7

9. TESTMERKMALE

9.1. Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität wird definiert als die Kapazität des Tests, den Analyten genau zu bestimmen bei Vorhandensein von potentiellen Interferenz-Faktoren in der Proben-Matrix (z.B. Hämolyse, Effekte der Proben-Behandlung), oder Kreuzreaktionen mit potentiell interferierenden Analyten.

Da in diesem Fall die Konzentration der zu untersuchenden Substanz in vitro freigesetzt und davon der Leerwert subtrahiert wird, ist die Spezifität des verwendeten Antikörpers nicht entscheidend.

Stärker als die Kreuzreaktionen mit zirkulierenden angiotensinähnlichen Peptiden können Plasmaproteine des Probenleerwertes die Sensitivität des Tests vermindern. Der Probenleerwert ist die Summe der Teilwerte aus angiotensinähnlichen Proteinen und zirkulierendem Angiotensin I und des durch die Erzeugung von Renin in der Zeit von der Probengewinnung bis zum Test entstandenen Angiotensins I.

Interferenzen. Kontrollstudien über potentiell interferierende Faktoren haben gezeigt, dass die Leistungen des Tests nicht durch Lipämie (bis 500 mg/dL Triglyzeride), Bilirubinämie (bis 20 mg/dL Bilirubin), Angiotensin I-Werte in Proben, die 1000 mg/dL Hämoglobin enthalten, sind etwa 10% niedriger als Angiotensin I-Werte in normalen Proben.

Kreuzreaktionen. Die nach Abraham berechneten Kreuzreaktionswerte in Prozent einiger angiotensinähnlichen Peptiden geben die Spezifität des verwendeten Antikörpers an.

- Angiotensin I 100%
- Angiotensin II < 0,1%
- Hepta- und Hexapeptide << 0,02%

9.2. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität kann auch als Nachweisgrenze ausgedrückt werden, d.h. die minimale Quantität des Analyten, die durch den Test bestimmt werden kann. Die Nachweisgrenze ist 0,20 ng/mL bei einer Konfidenz-Grenze von 95%. Sie wurde als die scheinbare Analyt-Konzentration berechnet, die man vom Nullkalibrator unterscheiden kann, d.h. zwei Standardabweichungen unter dem Nullkalibrator.

9.3. Präzision

Zur Ermittlung der Wiederholpräzision und der Vergleichpräzision des Tests (d.h. Intra- und Inter-Assay) wurden verschiedene Probenpools unterschiedlicher PRA-Werten untersucht.

Wiederholpräzision	A	B	C
Anzahl der Bestimmungen	10	10	10
Mittelwert (ng/mL/Stunde)	2,3	8,8	13,5
Standardabweichung	0,17	0,48	1,34
Variationskoeffizient (%)	7,5	5,4	9,9

Vergleichpräzision	A	B	C
Anzahl der Bestimmungen	10	10	10
Mittelwert (ng/mL/Stunde)	2,6	8,6	13,0
Standardabweichung	0,20	0,70	1,50
Variationskoeffizient (%)	7,7	8,1	11,5

9.4. Richtigkeit

Die Richtigkeit der Bestimmung wurde mit Verdünnungs- und Wiederfindungstests geprüft.

Verdünnungstest. Es wurden zwei Plasmaproben mit hohen Angiotensin I-Konzentrationen nach serieller Verdünnung mit dem Nullkalibrator getestet.

Verdünnung	Erwartete Konzentration, ng/mL	Erhaltene Konzentration, ng/mL	% Wiederfindung
leer	–	17,5	–
1:2	8,75	8,6	98,3
1:4	4,38	4,5	102,9
1:8	2,19	2,3	105,1
1:16	1,09	1,1	100,6
leer	–	8,5	–
1:2	4,25	4,4	103,5
1:4	2,13	2,2	103,5
1:8	1,06	1,1	103,5
1:16	0,53	0,5	94,1

Wiederfindungstest. Zwei Plasmaproben mit einer niedrigen Angiotensin I-Konzentration wurden als solche und nach Zugabe bekannter Mengen an Angiotensin I getestet.

Zugegebene Konzentration, ng/mL	Erwartete Konzentration, ng/mL	Erhaltene Konzentration, ng/mL	% Wiederfindung
–	–	11,2	–
1,5	7,1	7,0	98,6
5,0	10,6	10,7	100,9
25,0	30,6	30,0	98,0
–	–	15,6	–
1,5	9,3	9,1	97,8
5,0	12,8	12,2	95,3
25,0	32,8	30,7	93,6

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

Der PRA-Test ist nur diagnostisch wertvoll, wenn er unter Kontrolle der Natrium- und Kaliumzufuhr und Berücksichtigung der Körperstellung bei der Probengewinnung durchgeführt wird. Die Reninsekretion beeinflussende Medikamente und Diuretika, Clonidin, Betarezeptorenblocker, Östrogenprogestone und peripher wirksame Vasodilatoren beeinträchtigen den Aussagewert des Tests.

Die Diagnose darf nicht auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden, sondern muss zusammen mit anderen klinischen Untersuchungen, Diagnoseverfahren und nach dem Urteil des Arztes erfolgen.

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholte Tiefgefrieren- und Auftauen-Zyklen können die Ergebnisse der Bestimmung ändern.

Die einwandfreie Beherrschung der Arbeitstechnik und die strikte Einhaltung der Arbeitsanleitung sind Voraussetzung für die Erzielung zuverlässiger Ergebnisse. Auf präzise Herstellung und Verteilung der Reagenzien und gutes Pipettieren und gründliches Absaugen ist zu achten.

Nicht wiederholbare Proben können folgende Ursachen haben:

- Vertauschen der Fläschchenverschlüsse.
- Verwendung derselben Pipettenspitze beim Pipettieren aus verschiedenen Reagenzfläschchen oder beim Pipettieren unterschiedlicher Proben.
- Aufbewahren der Reagenzien oder Proben bei hohen Temperaturen (> 25°C) und bakterielle Kontamination.
- Bakterielle Kontamination durch zu langes Offenlassen der Fläschchen.
- Unzureichendes Absaugen der Röhren.
- Kontamination der Röhrenränder durch Tracer oder Proben.
- Schlechte Detektorstandardisierung und fehlerhafte Bedienung des Counters.
- Verwendung von Reagenzien aus verschiedenen Chargen.

11. WARNUNGEN

Die Testkomponenten enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Weil Natriumazid explosives Blei oder Kupferazid in Rohrleitungen bilden kann, wird empfohlen, den Abfluss, nach dem Wegschütten von Substanzen, die Natriumazid enthalten, vollständig mit Wasser durchzuspülen (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

R 31 – Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.

S 28 – Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit vielem Wasser.

S 45 – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).

PMSF (Council Directive 99/45/EC):

R 22 – Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

R 36/38 – Reizt die Augen und die Haut.

S 45 – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).

Äthylalkohol (Council Directive 99/45/EC):

R 11 – Leichtentzündlich.

S 7 – Behälter dicht geschlossen halten.

S 16 – Von Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.

Alle für die Herstellung der Kit-Komponenten benutzten Serum- und Plasmaproben wurden analysiert und als nichtreaktiv für HBsAg, Anti-HCV und Anti-HIV-1/2 befunden. Da jedoch kein Prüfverfahren Keimfreiheit wirklich garantieren kann, sollten alle Präparate menschlicher Herkunft als potentiell infektiös angesehen und dementsprechend vorsichtig behandelt werden.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Essen, Trinken, Rauchen und Schminken sind im Labor verboten.
- Lösungen dürfen nicht mit dem Mund pipettiert werden.
- Der direkte Kontakt mit potentiell infiziertem Material ist durch das Tragen von Laborkitteln, Schutzbrille und Einweghandschuhen zu vermeiden. Nach Beendigung des Tests sollten die Hände gründlich gewaschen werden.
- Verspritzen oder Bildung von Aerosol sind zu vermeiden. Verschüttete Reagenzien sollten mit 5%iger Natriumhypochlorit-Lösung entfernt werden. Dabei ist zu beachten, dass es sich hierbei um potentiell infektiöses Material handeln kann.
- Alle Proben, biologischen Reagenzien und für die Testdurchführung verwendeten Materialien müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Die Beseitigung des Abfalls ist nach den Vorschriften der zuständigen Aufsichtsbehörde sowie nach den Anweisungen des verantwortlichen Amtes durchzuführen. Abfall sollte verbrannt werden. Flüssigkeiten müssen mit Natriumhypochlorit dekontaminiert werden. Dabei sollte das Natriumhypochlorit in einer Konzentration von 5% im Endgemisch vorliegen und mindestens 30 Minuten auf die zu beseitigenden Materialien einwirken. Alle Materialien, die wieder verwendet werden sollen, müssen mit einer übertriebenen (*overkill*) Methode (USP 24, 2000, S. 2143) autoklaviert werden. Im Allgemeinen wird eine Stunde bei 121°C als angebrachte Sterilisationszeit angesehen, dennoch wird jedem Benutzer empfohlen, die Wirksamkeit des Dekontaminationszyklus anfangs zu überprüfen und routinemäßig biologische Indikatoren einzusetzen.

13. GRUNDREGELN DES STRAHLENSCHUTZES

Reagenzien mit Jod-125

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit höchstens 2,1 µCi (76 kBq) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Labors oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und den Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung wischen. Alle benutzten Glasbehälter gründlichst mit Wasser spülen, bevor sie zusammen mit anderen Laborbehältern aus Glas ausgewaschen werden.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

WICHTIGER HINWEIS: Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität des Kits angibt.

**RENCTK
PIPETTIERSCHEMA**

BITTE SORGFÄLTIG DIE GEBRAUCHSANLEITUNG BEACHTEN.

1. PROBENLEERWERT IM EISBAD

RÖHRCHEN I

PROBEN	500 μ L
--------	-------------



ENZYMHEMMER (PMSF)	10 μ L
--------------------	------------



REAKTIONSPUFFER	50 μ L
-----------------	------------



INKUBATION: IM EISBAD.

2. ANGIOTENSIN I-ERZEUGUNG

RÖHRCHEN II

PROBEN	} 200 μ L
PMSF	
REAKTIONSPUFFER	



INKUBATION: 90 MIN. BEI 37°C.



EISBAD.

3. TESTANSATZ AUS R I UND R II IM EISBAD IN BESCHICHTETEN RÖHRCHEN

KALIBRATOREN, PROBENLEERWERTE (ANSATZ 1) UND PROBEN (ANSATZ 2)	50 μ L
---	------------



TRACER	500 μ L
--------	-------------



MISCHEN.



INKUBATION: 3-24 Std. BEI RAUMTEMPERATUR.



ABSAUGEN.



RADIOAKTIVITÄT MESSEN.

KIT PARA LA DETERMINACIÓN RADIOINMUNOLÓGICA DE LA ANGIOTENSINA I

Procedimiento para la medición de la actividad de la renina plasmática (PRA) mediante el ensayo cuantitativo de la angiotensina I en muestras de plasma humano

Sólo para uso in vitro

1. INTRODUCCIÓN

La renina es una enzima proteolítica con un peso molecular de unos 40.000 daltons, producida por el aparato yuxtaglomerular del riñón. Esta enzima divide su sustrato, el angiotensinógeno, formando un decapeptido, la angiotensina I, con un peso molecular de unos 1.300 daltons. Después, este polipéptido es hidrolizado por la enzima de conversión (ACE) en el octapéptido biológicamente activo, la angiotensina II.

El producto hormonal del sistema renina-angiotensina, la angiotensina II, tiene una vida media biológica sumamente breve, pero es el agente vasopresor conocido más potente; sus efectos principales son la vasoconstricción, la estimulación del sistema nervioso simpático y la estimulación de la secreción de la aldosterona por parte de la glándula suprarrenal.

Dado que los niveles de angiotensina I son una representación directa de la actividad de la renina plasmática, la medición de ésta última ha sido adoptada ampliamente para evaluar el sistema renina-angiotensina en condiciones patológicas. La medición de la actividad de la renina plasmática (PRA) en los hipertensos es de ayuda importante en el diagnóstico diferencial de aldosteronismo primario y secundario.

Varios factores influyen en la secreción de la renina plasmática, que es inhibida por los niveles plasmáticos de angiotensina II y de ADH, por una retención más alta de sodio y potasio y por una mayor presión de perfusión renal. Por otra parte, una falta de sodio y potasio, una reducida presión de perfusión renal y la actividad del sistema nervioso simpático inducen una mayor secreción de renina.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La medida de la actividad de la renina plasmática está basada en el ensayo radioinmunológico de la angiotensina I. Dos son las fases esenciales del procedimiento:

- formación de angiotensina I en muestras de plasma mediante incubación a 37°C en condiciones adecuadas para prevenir la degradación enzimática de la angiotensina I (presencia del inhibidor enzimático PMSF) y consideradas las más indicadas para la actividad de la renina plasmática
- ensayo radioinmunológico de angiotensina I en tubos recubiertos en dos alícuotas de la misma muestra, una incubada a 37°C para la formación de angiotensina I y una no incubada (blanco de la muestra).

El principio del ensayo radioinmunológico consiste en la competición entre angiotensina I marcada y angiotensina I contenida en los calibradores o en las muestras para el número fijo y limitado de sitios anticorpales. Después de la incubación RIA, la cantidad de angiotensina I marcada enlazada al anticuerpo fijado en los tubos recubiertos es inversamente proporcional a la concentración de angiotensina I no marcada presente en los calibradores o en las muestras. El método adoptado para la separación libre/enlazado está basado en el empleo de los tubos recubiertos, en donde el anticuerpo está fijado a las paredes de los tubos.

3. REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT

Tubos recubiertos	100
Angiotensina I marcada con ¹²⁵ I	2 viales
Calibradores de angiotensina I	6 viales
Plasma de control	1 vial
Tampón de formación	1 vial
Inhibidor enzimático (PMSF)	1 vial
Número de ensayos	100

MODO DE CONSERVACIÓN: A su llegada conserve el kit a 2-8°C. No congele. Después de la apertura, los reactivos de este kit son estables hasta la fecha de caducidad del kit si se conservan de manera adecuada. El kit está garantizado para 3 sesiones analíticas si los reactivos se conservan según las recomendaciones del fabricante.

No use los reactivos pasada la fecha de caducidad. La fecha de caducidad del kit está escrita en la etiqueta exterior y corresponde a la fecha de caducidad del trazador. La fecha de caducidad de cada componente está indicada en las etiquetas de los respectivos viales.

Al reconstituir el contenido de los viales, agite delicadamente para evitar la formación de espuma. No mezcle los reactivos provenientes de lotes diferentes.

3.1. Tubos recubiertos

La superficie interior de cada tubo está recubierta con IgG de conejo anti-angiotensina I biotinilada. En el momento del uso, ponga los tubos recubiertos a temperatura ambiente antes de abrir el contenedor, para evitar condensaciones de humedad.

Los tubos no utilizados pueden ser conservados controlando que el contenedor esté bien cerrado. No mezcle lotes diferentes de tubos recubiertos.

3.2. Ilev-5-angiotensina I marcada con ¹²⁵I (roja): reactivo liofilizado

Cada vial contiene hormona marcada con ¹²⁵I, albúmina sérica bovina, tampón fosfato, estabilizadores, conservantes y un colorante rojo inactivo. La radioactividad máxima es de 81 kBq (2,2 µCi) por vial en la fecha de calibración. Reconstituya el contenido de cada vial con 26 mL de agua destilada. Conserve la solución que resulta en alícuotas congeladas a -20°C o a temperaturas inferiores.

3.3. Calibradores de ileu-5-angiotensina I: reactivo liofilizado

Cada vial contiene cantidades crecientes de angiotensina I, albúmina sérica bovina, tampón fosfato y conservantes. Reconstituya el contenido de cada vial con 1 mL de agua destilada. Las soluciones que resultan contendrán respectivamente 0 - 0,3 - 1 - 3 - 10 - 50 ng/mL y se deben conservar en alícuotas congeladas a -20°C o a temperaturas inferiores. *Los calibradores del kit son conmutables con las muestras en examen cuando se utilizan con los reactivos y con el procedimiento operativo de este test diagnóstico in vitro, según las recomendaciones del fabricante.*

3.4. Plasma de control: reactivo liofilizado

El vial contiene plasma humano y conservantes. El rango de concentraciones de cada control aparece en el certificado de análisis, e indica los límites definidos por DiaSorin para los valores de control que se pueden obtener a partir de ensayos fiables.

Reconstituya el contenido del vial con 2 mL de agua destilada fría, evitando que la temperatura supere los 4°C. Conserve la solución que resulta en alícuotas congeladas a -20°C o a temperaturas inferiores.

El plasma de control se debe tratar como una muestra y la angiotensina I se debe formar durante 90 minutos a 37°C antes del ensayo.

3.5. Tampón de formación (azul): reactivo listo para el uso

El vial contiene 4 mL de solución de tampón citrato, estabilizadores, conservantes y un colorante azul inactivo.

3.6. Inhibidor enzimático (PMSF): reactivo listo para el uso

El vial contiene 1,0 mL de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) al 5% (R 23/24/25, S 36, S 45) en solución de etanol (R 11, S 7, S 16).

Si el producto a 2-8°C tiende a cristalizarse, caliéntelo a 37°C.

4. MATERIALES E INSTRUMENTOS REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada y desionizada.
- Útiles de laboratorio de vidrio.
- Tubos de plástico desechables.
- Gradillas para tubos.
- Micropipetas con puntas desechables de 10, 50 µL (veracidad ± 3%, precisión 2%) y 200, 500 µL (veracidad ± 2%, precisión 1%).
- Agitador Vórtex.
- Baño termostático para mantener 37° ± 1°C.
- Sistema para aspirar la mezcla de incubación.
- Contador gamma para contar el yodo ¹²⁵I (establecimiento de la ventana del contador: 15-80 keV - eficiencia del contador: 70% - tiempo de cómputo: 1 min). Si la eficiencia del contador es inferior al 60%, el tiempo de cómputo debe ser prolongado a 2 min.

5. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Recogida de las muestras

Se recomienda estandarizar cuidadosamente la preparación del paciente y las condiciones de recogida de la muestra. Se aconseja recoger la sangre en tubos pre-refrigerados con EDTA sódico como anticoagulante. *Las muestras de sangre no se deben recoger usando heparina como anticoagulante, ya que ésta interfiere con la formación de angiotensina I. Por el contrario, el EDTA presenta la ventaja de ser un anticoagulante eficaz y contribuir al mismo tiempo a la inhibición de la enzima de conversión.*

Las muestras se deben mantener a 2-8°C y centrifugar en frío a unas 2000 gravedades para separar el plasma. Clarifique por filtración o centrifugación antes del ensayo las muestras que presenten material en suspensión, opalescencia, lipemia o residuos eritrocitarios. No use muestras fuertemente hemolizadas o lipémicas, ni muestras que presenten material suspendido o evidente contaminación microbiana. Si el ensayo no se lleva a cabo inmediatamente, las muestras se deben subdividir en alícuotas congeladas a -20°C o a temperaturas inferiores hasta el momento del ensayo. Si las muestras han sido descongeladas, agítelas con cuidado antes de realizar el ensayo, evitando que la temperatura supere los 4°C. Evite repetidas congelaciones y descongelaciones.

Formación de angiotensina I

La formación de angiotensina I a pH 6,0 se desarrolla en condiciones óptimas para la acción de la renina plasmática con la consiguiente mejor sensibilidad para las muestras con baja actividad de la renina plasmática y posible empleo de tiempo de formación más breve. Las condiciones de formación preelegidas permiten trabajar con la mínima dilución posible de la muestra, reduciendo el efecto de la dilución en la cinética de formación de angiotensina I.

- Añada los reactivos en tubos de formación **no recubiertos** conservados en baño de hielo, **respetando estrictamente este orden**:
 - . 500 µL de muestra
 - . 10 µL de PMSF
 - . 50 µL de tampón de formación.
- Agite el contenido de los tubos en el Vórtex y transfiera 200 µL de cada muestra a una segunda serie de tubos no recubiertos.

- Incube la segunda serie de tubos en baño termostático a 37°C durante 90 minutos y mantenga la primera serie de tubos en baño de hielo (blancos de las muestras).

El tiempo de formación sugerido es un tiempo medio que permite una formación de angiotensina I suficiente para evaluar la mayor parte de las condiciones fisiopatológicas. Cuando se prevén valores más altos o más bajos, el tiempo de formación puede ser respectivamente abreviado o bien prolongado, ya que la cantidad de angiotensina I formada es una función lineal del tiempo (Fig. 1).

- Después de la incubación a 37°C los tubos para la formación de angiotensina I se deben transferir inmediatamente en baño de hielo.

6. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

Ponga los reactivos a temperatura ambiente (20-25°C) antes del ensayo. Prevea determinaciones por duplicado como mínimo. Los calibradores se deben usar directamente en el ensayo RIA con tubos recubiertos sin someterlos antes a la formación de angiotensina I. Se debe realizar la determinación de los calibradores para cada serie de muestras analizadas. El procedimiento operativo debe ser exactamente idéntico para los calibradores y para las muestras en examen.

Realice todas las fases del ensayo en el orden previsto, sin interrupción.

Utilice puntas desechables nuevas para dispensar calibradores y muestras.

- Distribuya los reactivos en el fondo de los tubos recubiertos. Actúe según el siguiente esquema:

reactivos \ tubos	Calibradores 0-5	Muestras y blancos
Calibradores	50 µL	–
Muestras	–	50 µL
Trazador	500 µL	500 µL

- **Agite** en el Vórtex el contenido de los tubos e **incube de 3 a 24 horas a temperatura ambiente**.
- **Aspire** cuidadosamente la mezcla de incubación. *Verifique que el líquido sea eliminado completamente, controlando que la punta de la pipeta de aspiración toque el fondo de los tubos recubiertos. La presencia de gotas adherentes a las paredes de los tubos recubiertos puede provocar baja reproducibilidad o resultados no fiables. No debe quedar traza del colorante.*
- **Mida la radioactividad** de los tubos.

7. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcule la media de los cómputos para cada grupo de tubos después de haber substraído el valor del fondo. Exprese la media de los cómputos de los calibradores y las muestras como porcentaje respecto al calibrador cero:

$$B/Bo\% = \frac{\text{cómputo medio calibradores o muestras}}{\text{cómputo medio calibrador cero}} \times 100$$

Indique en un gráfico semilog el porcentaje medio calculado para cada calibrador en la ordenada (eje de las y) en función de la concentración de angiotensina I expresada en ng/mL en la abscisa (eje de las x). De esta manera se obtiene una curva de calibración (Fig. 2).

La actividad de la renina plasmática (PRA) se calcula en ng de angiotensina I formados para mL por hora, con el procedimiento indicado:

- directamente de la curva de calibración lea la concentración de angiotensina I formada para cada muestra incubada a 37°C y para el respectivo blanco de la muestra (conservado en baño de hielo)
- reste del valor de cada muestra el valor del blanco correspondiente
- multiplique el valor obtenido por 1,12 ya que la muestra ha sido diluida inicialmente 1:1,12
- divida las concentraciones obtenidas por el tiempo de formación expresado en horas:

$$PRA = \frac{(\text{ng } 37^{\circ}\text{C} - \text{ng } 4^{\circ}\text{C}) \times 1,12}{\text{horas de incubación}} = \text{ng/mL/hora.} \quad (1)$$

Para un tiempo de formación de 1,5 horas la fórmula (1) se puede simplificar así:

$$PRA = (\text{ng } 37^{\circ}\text{C} - \text{ng } 4^{\circ}\text{C}) \times 0,747 = \text{ng/mL/hora.}$$

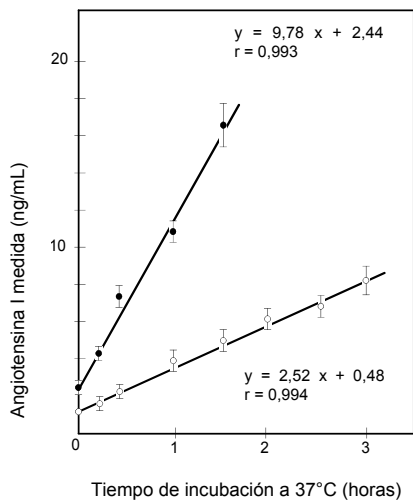


Fig. 1 - Control de la linealidad de la formación de angiotensina I aumentando el tiempo de incubación a 37°C a pH 6,0.

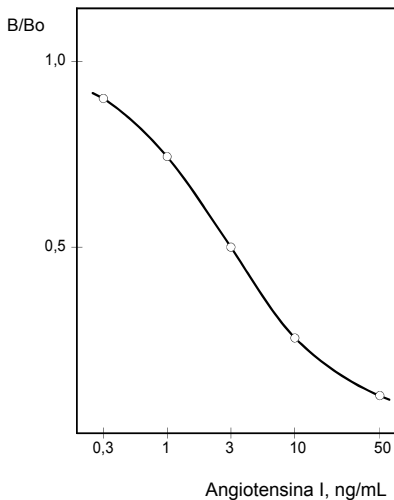


Fig. 2

Ejemplo de cálculo

Los siguientes datos deben ser considerados sólo un ejemplo y no deben usarse en lugar de los datos obtenidos por el utilizador.

Descripción	cpm	B/Bo x 100
Calibrador cero	19.230	100
0,3 ng/mL	17.692	92,0
1 ng/mL	14.519	75,5
3 ng/mL	9.807	51,0
10 ng/mL	5.000	26,0
50 ng/mL	2.115	11,0
Blanco de la muestra	17.499	91,0
Muestra	9.038	47,0

Interpolando de la curva de calibración y aplicando la fórmula (1), la muestra resulta contener una actividad de la renina plasmática (PRA) de 2,39 ng/mL/hora.

$$PRA = \frac{(3,5 - 0,3) \times 1,12}{1,5} = 2,39 \text{ ng/mL/hora.}$$

8. DATOS CLÍNICOS

Los valores mostrados en la tabla siguiente son solamente indicativos para una aportación de sodio de 100-150 mEq/24 horas. Se recomienda a cada laboratorio que establezca sus propios intervalos de referencia.

Formación a pH 6,0	Posición supina	Posición erguida
PRA, ng/mL/hora	0,2 - 2,8	1,5 - 5,7

9. PRESTACIONES METODOLÓGICAS DEL KIT

9.1. Especificidad analítica

La especificidad analítica se define como la capacidad que tiene el test para detectar exactamente el analito ante la presencia de factores potencialmente interferentes en la matriz de la muestra (por ejemplo, hemólisis, efectos de tratamientos de la muestra) o de reacciones cruzadas con analitos potencialmente interferentes.

Dado que, en este caso particular, la cantidad de sustancia que hay que ensayar se forma in vitro y el blanco de la muestra se resta, la especificidad real del anticuerpo anti-angiotensina I no es crítica.

En cualquier caso, más que las interferencias con péptidos circulantes similares a la angiotensina, son las interferencias de las proteínas de la muestra (blanco de la muestra) las que limitan la sensibilidad del ensayo. El blanco de la muestra incluye las aportaciones de proteínas similares a la angiotensina y de la angiotensina I circulante y formada por la acción de la renina plasmática incluso a bajas temperaturas desde el momento de la recogida de la sangre hasta el momento del ensayo.

Interferencias. Estudios controlados sobre los factores potencialmente interferentes han demostrado que las prestaciones del test no están influenciadas por lipemia (hasta 500 mg/dL de triglicéridos), bilirrubinemia (hasta 20 mg/dL de bilirrubina). Los valores de angiotensina I obtenidos con las muestras que contienen 1000 mg/dL de hemoglobina resultan aproximadamente del 10% inferiores a los valores obtenidos con las muestras normales.

Reacciones cruzadas. Los porcentajes de reacciones cruzadas de algunos péptidos similares a la angiotensina, calculados según Abraham, muestran la especificidad del anticuerpo usado.

- Angiotensina I 100%
- Angiotensina II < 0,1%
- Eptapéptido, hexapéptido << 0,02%

9.2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se puede expresar también como el límite de detección, es decir la cantidad mínima de analito específico que el test puede detectar. El límite de detección es de 0,20 ng/mL al 95% de confianza. Ha sido calculado como la concentración aparente de analito distinguible del calibrador cero, es decir, dos desviaciones estándar por debajo de cero.

9.3. Precisión

La repetibilidad y la reproducibilidad del ensayo (es decir las variaciones intra-ensayo e inter-ensayo) han sido determinadas utilizando las muestras de referencia en diferentes niveles de PRA.

Repetibilidad	A	B	C
Número de determinaciones	10	10	10
Media (ng/mL/hora)	2,3	8,8	13,5
Desviación estándar	0,17	0,48	1,34
Coefficiente de variación (%)	7,5	5,4	9,9

Reproducibilidad	A	B	C
Número de determinaciones	10	10	10
Media (ng/mL/hora)	2,6	8,6	13,0
Desviación estándar	0,20	0,70	1,50
Coefficiente de variación (%)	7,7	8,1	11,5

9.4. Veracidad

La veracidad del ensayo ha sido controlada mediante los test de dilución y recuperación.

Test de dilución. Se han determinado diluciones en serie de dos muestras de plasma de concentración elevada de angiotensina I realizadas en el calibrador cero.

Dilución	Concentración esperada, ng/mL	Concentración medida, ng/mL	% Recuperación
no diluido	–	17,5	–
1:2	8,75	8,6	98,3
1:4	4,38	4,5	102,9
1:8	2,19	2,3	105,1
1:16	1,09	1,1	100,6
no diluido	–	8,5	–
1:2	4,25	4,4	103,5
1:4	2,13	2,2	103,5
1:8	1,06	1,1	103,5
1:16	0,53	0,5	94,1

Test de recuperación. Se han determinado dos muestras de plasma con baja concentración de angiotensina I tanto no diluidas como después de la adición de cantidades crecientes de angiotensina I.

Concentración adicionada, ng/mL	Concentración esperada, ng/mL	Concentración medida, ng/mL	% Recuperación
–	–	11,2	–
1,5	7,1	7,0	98,6
5,0	10,6	10,7	100,9
5,0	30,6	30,0	98,0
–	–	15,6	–
1,5	9,3	9,1	97,8
5,0	12,8	12,2	95,3
25,0	32,8	30,7	93,6

10. LIMITACIONES DEL ENSAYO

El significado clínico de la determinación de la actividad de la renina plasmática se puede invalidar si la aportación diaria de sodio y potasio o la postura del paciente no se tienen bajo control, o cuando se suministren fármacos como diuréticos, clonidina, agentes beta-bloqueantes, estroprogestínicos, vasodilatadores periféricos, que alteran la secreción de la renina plasmática.

El diagnóstico no se debe formular en base al resultado de un solo ensayo, sino que éste se debe validar con otras pruebas clínicas, procedimientos diagnósticos y con la opinión del médico.

La contaminación bacteriana o las repetidas congelaciones/descongelaciones de las muestras pueden modificar los resultados del test.

Para obtener resultados fiables, es necesario respetar estrictamente las instrucciones de utilización y poseer una adecuada técnica manual. En concreto, la precisión y el cuidado en las fases de reconstitución y distribución de los reactivos y de aspiración son indispensables para la fiabilidad del ensayo.

Resultados no reproducibles se deben principalmente a factores metodológicos, como por ejemplo:

- cambio de las tapas entre los viales
- uso de la misma punta para la recogida de diferentes viales o para dispensar diferentes muestras
- viales que se han dejado abiertos durante un largo período de tiempo
- exposición de los reactivos o de las muestras a calor intenso o a fuertes fuentes de contaminación bacteriana
- aspiración inadecuada de la mezcla de incubación
- contaminación del borde de los tubos con el trazador o bien con las muestras
- oscilaciones casuales o mal mantenimiento del contador gamma
- intercambio de reactivos procedentes de diferentes lotes.

11. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Los componentes del kit contienen azida sódica como conservante. Ya que, la azida sódica puede formar azidas de plomo o de cobre explosivas en las tuberías, se recomienda dejar fluir agua en abundancia en los desagües después de la eliminación de soluciones que contengan azida sódica (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Nocivo por ingestión.

R 31 – En contacto con ácidos libera gases tóxicos.

S 28 – En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.

S 45 – En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

PMSF (Council Directive 99/45/EC):

R 22 – Nocivo por ingestión.

R 36/38 – Irrita los ojos y la piel.

S 45 – En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

Etolanol (Council Directive 99/45/EC):

R 11 – Fácilmente inflamable.

S 7 – Manténgase el recipiente bien cerrado.

S 16 – Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas. No fumar.

Todas las unidades de suero o plasma utilizadas para la fabricación de los componentes de este kit se han analizado y se han determinado no reactivas para HBsAg, para anti-HCV y para anti-HIV-1/2. Sin embargo, visto que ningún método puede asegurar que los agentes patógenos estén ausentes, todo el material de origen humano se debería considerar potencialmente infeccioso y ser manipulado como tal.

12. NORMAS DE SEGURIDAD

- No coma, beba, fume o se maquille durante la ejecución del ensayo.
- No pipetee las soluciones con la boca.
- Evite el contacto directo con el material potencialmente infeccioso usando batas de laboratorio, gafas de protección y guantes desechables. Lávese cuidadosamente las manos al terminar el ensayo.
- Evite salpicaduras o formación de aerosoles. En caso de que esto sucediera, cada gota de reactivo se debe eliminar con una solución de hipoclorito sódico al 5% y el medio utilizado se deberá tratar como material residuo potencialmente infeccioso.
- Todas las muestras, los reactivos biológicos del kit y los materiales usados para efectuar el ensayo se deben considerar capaces de transmitir agentes infecciosos; por lo tanto, los residuos se deberán eliminar de acuerdo con las reglamentaciones de las agencias autorizadas que tengan jurisdicción sobre el laboratorio y con las normativas de cada país. El material desechable deberá ser incinerado; los residuos líquidos deberán ser descontaminados con una solución de hipoclorito sódico a una concentración final del 5% durante media hora como mínimo. Cualquier material que pueda ser reutilizado deberá ser tratado en autoclave con un tratamiento de exceso (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente se considera que una hora a 121°C es un tiempo de esterilización adecuado; sin embargo se recomienda a cada usuario que verifique la eficacia del ciclo de descontaminación mediante una validación inicial y el uso rutinario de indicadores biológicos.

13. REGLAS BÁSICAS DE SEGURIDAD CONTRA LAS RADIACIONES

Reactivos con contenido de azida sódica

Este equipo contiene material radiactivo que no supera de 2,1 µCi (76 kBq) de yodo-125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas in vitro clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución decontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

ATENCIÓN: La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

ESQUEMA DEL ENSAYO

- 1- RECONSTITUYA LOS REACTIVOS.
- 2- REALICE LA FORMACIÓN DE ANGIOTENSINA I DURANTE 90 MINUTOS A 37°C EN TUBOS NO RECUBIERTOS.
- 3- MARQUE LOS TUBOS RECUBIERTOS POR DUPLICADO PARA EL ENSAYO RIA.
- 4- DISTRIBUYA LOS REACTIVOS SEGÚN EL SIGUIENTE ESQUEMA Y AGITE LA MEZCLA DE INCUBACIÓN:

REACTIVOS	TUBOS	CAL 0-5	MUESTRAS Y BLANCOS
CALIBRADORES		50 µL	-
MUESTRAS		-	50 µL
TRAZADOR		500 µL	500 µL

- 5- INCUBE DE 3 A 24 HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE.
- 6- ASPIRE LA MEZCLA DE INCUBACIÓN.
- 7- MIDA LA RADIOACTIVIDAD DE LOS TUBOS.

TESTE RADIOIMUNOLÓGICO DA ANGIOTENSINA I
Procedimento para a medição da actividade da renina plasmática (PRA)
mediante o teste quantitativo da angiotensina I
em amostras de plasma humano

Só para uso in vitro

1. INTRODUÇÃO

A renina é uma enzima proteolítica com peso molecular de 40.000 daltons aproximadamente, produzida pela células do sistema justaglomerular do rim. Esta enzima divide o seu substrato, o angiotensinogéneo, formando um decapeptido, a angiotensina I, de peso molecular de 1.300 daltons aproximadamente. Este polipeptido é, em seguida, hidrolisado pela enzima de conversão (ACE) no octopeptido biologicamente activo, a angiotensina II.

O produto hormonal do sistema renina-angiotensina, a angiotensina II, tem uma meia-vida biológica extremamente curta, mas é o mais potente vasoconstritor conhecido; os seus efeitos principais são a vasoconstrição, a estimulação do sistema nervoso simpático e a estimulação da secreção da aldosterona pelas glândulas supra-renais.

Dado que os níveis de angiotensina I são uma representação directa da actividade da renina plasmática, a sua medição foi amplamente adoptada para avaliar o sistema renina-angiotensina em condições patológicas. A medição da actividade da renina plasmática (PRA) nos hipertensos é uma importante ajuda no diagnóstico diferencial de aldosteronismo primário e secundário.

Diferentes factores influem na secreção da renina, que é inibida pelos níveis plasmáticos de angiotensina II e de ADH, pelo aumento da retenção de sódio e potássio e pelo aumento da pressão de perfusão renal. Por outro lado, a depleção de sódio e potássio, uma baixa pressão de perfusão renal e a actividade do sistema nervoso simpático induzem o aumento da secreção de renina.

2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

A medição da actividade da renina baseia-se no teste radioimunológico da angiotensina I. As fases essenciais do procedimento são duas:

- geração de angiotensina I em amostras de plasma mediante incubação a 37°C em condições capazes de prevenir a degradação enzimática da angiotensina I (presença do inibidor enzimático PMSF) e consideradas as mais indicadas para a actividade da renina
- teste radioimunológico de angiotensina I em tubos revestidos em duas alíquotas da mesma amostra, uma incubada a 37°C para a geração e uma não incubada (branco da amostra).

O princípio do ensaio radioimunológico consiste na competição entre angiotensina I marcada e angiotensina I contida nos calibradores ou nas amostras para o número fixo e limitado de sítios de anticorpos. Após a incubação RIA, a quantidade de angiotensina I marcada ligada ao anticorpo fixado nos tubos revestidos é inversamente proporcional à concentração de angiotensina I não marcada presente nos calibradores ou nas amostras. O método adoptado para a separação livre/ligado baseia-se no uso de tubos revestidos, onde o anticorpo é ligado às paredes dos tubos.

3. REAGENTES FORNECIDOS NO DISPOSITIVO

Tubos revestidos	100
Angiotensina I marcada com ¹²⁵ I	2 frascos
Calibradores de angiotensina I	6 frascos
Plasma de controlo	1 frasco
Tampão de geração	1 frasco
Inibidor enzimático (PMSF)	1 frasco
Número de testes	100

ARMAZENAGEM: Depois da recepção, armazene o dispositivo a 2-8°C. Não congele. Após a abertura, os reagentes deste dispositivo permanecem estáveis até ao final do prazo de validade do dispositivo, se mantidos de modo adequado. O dispositivo foi projectado para 3 execuções analíticas se os reagentes são mantidos consoante as recomendações do fabricante.

Não utilize reagentes expirados. O prazo de validade do dispositivo está descrito na etiqueta externa e corresponde ao prazo de validade do marcador. O prazo de validade de cada reagente está descrito na etiqueta de cada frasco.

Quando reconstituir o conteúdo dos frascos, agite devagarinho para evitar a formação de espuma. Não misture reagentes de lotes diferentes.

3.1. Tubos revestidos

A superfície interna de cada tubo é revestida com IgG de coelho anti-angiotensina I biotinizada. Antes de usar, deixe os tubos revestidos à temperatura ambiente antes de abrir a embalagem, para evitar condensação de humidade.

Conserve os tubos não utilizados certificando-se de que a embalagem esteja bem fechada. Não misture lotes diferentes de tubos revestidos.

3.2. I-Ieu-5-angiotensina I marcada com ¹²⁵I (vermelho): reagente liofilizado

Cada frasco contém hormona marcada com ¹²⁵I, albumina sérica bovina, tampão fosfato, estabilizadores, conservantes e um corante vermelho inerte. A radioactividade máxima é 81 kBq (2,2 µCi) por frasco na data de calibração. Reconstitua o conteúdo de cada frasco com 26 mL de água destilada. Conserve a solução resultante subdividida em alíquotas congeladas a -20°C ou a temperatura inferior.

3.3. Calibradores de ileu-5-angiotensina I: reagente liofilizado

Os frascos contêm quantidades crescentes de angiotensina I, albumina sérica bovina, tampão fosfato e conservantes. Reconstitua o conteúdo de cada frasco com 1 mL de água destilada. As soluções resultantes contêm respectivamente 0 - 0,3 - 1 - 3 - 10 - 50 ng/mL e devem ser conservadas subdivididas em alíquotas congeladas a -20°C ou a temperatura inferior. *Os calibradores do dispositivo são comutáveis com as amostras em análise quando foram utilizados com os reagentes e com o procedimento operativo deste teste de diagnóstico in vitro, consoante as recomendações do fabricante.*

3.4. Plasma de controlo: reagente liofilizado

O frasco contém plasma humano e conservantes. O intervalo de concentrações de cada controlo é referido no certificado de análise e indica os limites estabelecidos pela DiaSorin para os valores de controlo que podem ser obtidos em ensaios fidedignos. Reconstitua o conteúdo do frasco com 2 mL de água destilada fria, evitando que a temperatura ultrapasse 4°C . Conserve a solução resultante subdividida em alíquotas congeladas a -20°C ou a temperatura inferior.

O plasma de controlo deve ser tratado como uma amostra e a angiotensina I gerada por 90 min a 37°C antes do teste.

3.5. Tampão de geração (azul): reagente pronto a usar

O frasco contém 4 mL de solução de tampão citrato, estabilizadores, conservantes e um corante azul inerte.

3.6. Inibidor enzimático (PMSF): reagente pronto a usar

O frasco contém 1,0 mL de fenilmetilsulfonil fluoreto a 5% (PMSF) (R 23/24/25, S 36, S 45) em solução de etanol (R 11, S 7, S 16).

Se o produto a $2-8^{\circ}\text{C}$ tende a cristalizar, aqueça-o a 37°C .

4. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Água destilada e desmineralizada.
- Material de vidro.
- Tubos descartáveis de plástico.
- Suporte para tubos.
- Micropipetas com pontas descartáveis de 10, 50 μL (exactidão $\pm 3\%$, precisão 2%) e 200, 500 μL (exactidão $\pm 2\%$, precisão 1%).
- Agitador Vortex.
- Banho termostático ($37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$).
- Sistema para aspirar a mistura de incubação.
- Contador gama para contar o iodo ^{125}I (definição da janela do contador: 15-80 keV - eficiência do contador: 70% - tempo de contagem: 1 min). Se a eficiência do contador é inferior a 60%, o tempo de contagem deve ser prolongado a 2 min.

5. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Colheita das amostras

Recomenda-se a padronização cuidadosa da preparação do doente e das condições de colheita das amostras. É aconselhável recolher o sangue em tubos pré-refrigerados com EDTA sódico como anticoagulante. *As amostras de sangue não devem ser recolhidas usando heparina como anticoagulante, já que esta interfere na geração de angiotensina I. Ao contrário, o EDTA apresenta a vantagem de ser um eficaz anticoagulante e de contribuir, ao mesmo tempo, para a inibição da enzima de conversão.*

As amostras devem ser mantidas a $2-8^{\circ}\text{C}$ e, depois, centrifugadas a frio a cerca de 2000 gravidades para separar o plasma. As amostras que contêm partículas sólidas, turvas, lipémicas ou com fragmentos de eritrócitos podem necessitar de clarificação por filtragem ou centrifugação antes de serem testadas. As amostras muito hemolisadas ou lipémicas, bem como as amostras que contêm partículas sólidas ou que exibem evidente contaminação bacteriana, não devem ser utilizadas. Se o teste não for feito imediatamente, as amostras devem ser subdivididas em alíquotas e congeladas a -20°C ou a temperatura inferior até ao momento do ensaio. Se as amostras estiverem congeladas, deixe-as descongelar e misture bem antes de utilizar, evitando que a temperatura ultrapasse 4°C . Evite ciclos repetidos de congelação e descongelação.

Geração de angiotensina I

A geração de angiotensina I com pH 6,0 ocorre em condições ideais pela acção da renina, com consequente melhor sensibilidade para as amostras de baixa actividade de renina e possível utilização de tempos de geração mais curtos. As condições de geração escolhidas permitem operar com a mínima diluição da amostra possível, reduzindo o efeito da diluição sobre a cinética de geração de angiotensina I.

- Adicione os reagentes em tubos de geração **não revestidos**, mantidos em banho de gelo, **respeitando rigorosamente esta ordem**:
 - . 500 μL de amostra
 - . 10 μL de PMSF
 - . 50 μL de tampão de geração.
- Agite o conteúdo dos tubos com um agitador Vortex e transfira 200 μL de cada amostra em uma segunda série de tubos não revestidos.
- Incube a segunda série de tubos em banho termostático a 37°C por 90 min e mantenha a primeira série de tubos em banho de gelo (brancos das amostras).

O tempo de geração sugerido é um tempo médio que permite uma geração de angiotensina I suficiente para avaliar a maior parte das condições fisiopatológicas. Quando estiverem previstos valores mais altos ou mais baixos, o tempo de geração pode ser respectivamente abreviado ou prolongado, já que a quantidade de angiotensina I gerada é uma função linear do tempo (Fig. 1).
- Após a incubação a 37°C , os tubos de geração devem ser imediatamente transferidos em banho de gelo.

6. PROCEDIMENTO DO TESTE

A distribuição dos reagentes deve ser feita à temperatura ambiente (20-25°C), efectuando determinações ao menos em duplicado. Os calibradores devem ser usados directamente no teste RIA com tubos revestidos sem submetê-los a geração prévia de angiotensina I e devem ser testados em cada série de amostras de doentes. Os calibradores e as amostras devem ser submetidos ao mesmo processo e tempo de incubação. Execute todas as etapas do teste na ordem apresentada, sem muita demora entre cada etapa.

Utilize uma ponta descartável para dispensar cada calibrador e amostra.

- Distribua os reagentes *no fundo dos tubos revestidos* segundo o esquema abaixo:

	tubos	Calibradores	Amostras
reagentes		0-5	e brancos
Calibradores		50 µL	–
Amostras		–	50 µL
Marcador		500 µL	500 µL

- **Agite** o conteúdo dos tubos com um agitador Vortex e **incube de 3 a 24 horas à temperatura ambiente**.
- **Aspire** com cuidado a mistura de incubação. *Verifique se o líquido foi eliminado completamente, controlando se a ponta da pipeta de aspiração toca o fundo dos tubos revestidos. A presença de gotas aderentes nas paredes dos tubos revestidos pode provocar baixa reprodutibilidade ou resultados não fiáveis. Não devem permanecer resíduos do corante.*
- **Meça a radioactividade** dos tubos.

7. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Calcule a média das contagens para cada grupo de tubos, após ter subtraído o valor do fundo. Calcule a média das contagens de calibradores e amostras como percentagem em relação ao calibrador zero:

$$B/Bo\% = \frac{\text{contagem média de calibradores ou amostras}}{\text{contagem média do calibrador zero}} \times 100$$

Coloque as coordenadas em papel semi-logarítmico e faça a curva utilizando a ordenada (eixo dos y) para o valor médio da percentagem calculada para cada calibrador em função da concentração de angiotensina I expressa em ng/mL na abscissa (eixo dos x). Desta forma obtém-se uma curva de calibração (Fig. 2).

A actividade da renina plasmática (PRA) é calculada em ng de angiotensina I gerados por mL por hora, com o procedimento indicado:

- leia directamente da curva de calibração a concentração de angiotensina I gerada para cada amostra incubada a 37°C e para o respectivo branco da amostra (mantido em banho de gelo)
- subtraia do valor de cada amostra o valor do branco correspondente
- multiplique o valor obtido por 1,12, pois as amostras tinham sido inicialmente diluídas 1:1,12
- divida as concentrações obtidas pelo tempo de geração expresso em horas:

$$PRA = \frac{(\text{ng } 37^{\circ}\text{C} - \text{ng } 4^{\circ}\text{C}) \times 1,12}{\text{horas de incubação}} = \text{ng/mL/hora.} \quad (1)$$

Para um tempo de geração de 1,5 horas, a equação (1) pode ser assim simplificada:

$$PRA = (\text{ng } 37^{\circ}\text{C} - \text{ng } 4^{\circ}\text{C}) \times 0,747 = \text{ng/mL/hora.}$$

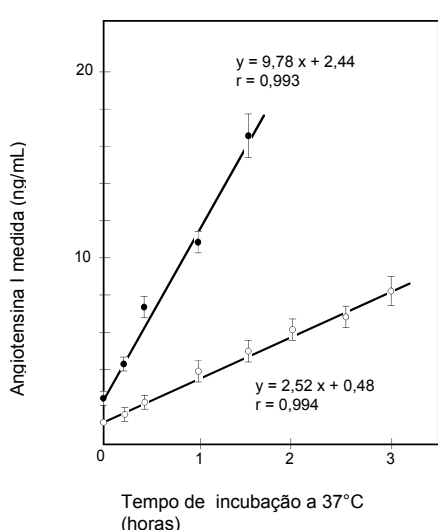


Fig. 1 - Controlo da linearidade da geração de angiotensina I aumentando o tempo de incubação a 37°C com pH 6,0.

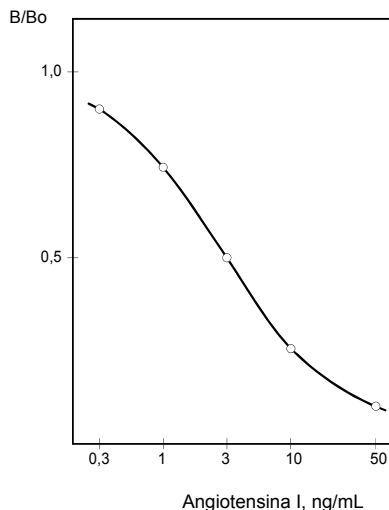


Fig. 2

Exemplo de cálculo

Os seguintes dados devem ser considerados apenas como um exemplo e não devem ser usados no lugar de dados obtidos pelo utilizador.

Descrição	Contagens	B/Bo x 100
Calibrador zero	19.230	100
0,3 ng/mL	17.692	92,0
1 ng/mL	14.519	75,5
3 ng/mL	9.807	51,0
10 ng/mL	5.000	26,0
50 ng/mL	2.115	11,0
Branco da amostra	17.499	91,0
Amostra	9.038	47,0

Interpolando da curva de calibração e aplicando a equação (1), a amostra resulta ter uma actividade da renina plasmática (PRA) de 2,39 ng/mL/hora.

$$PRA = \frac{(3,5 - 0,3) \times 1,12}{1,5} = 2,39 \text{ ng/mL/hora.}$$

8. VALORES ESPERADOS

Os valores indicados na tabela abaixo são apenas indicativos para uma introdução de sódio de 100-150 mEq/24 horas. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência clinicamente relevantes.

Geração com pH 6,0	Posição supina	Posição erecta
PRA, ng/mL/hora	0,2 - 2,8	1,5 - 5,7

9. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

9.1. Especificidade analítica

A especificidade analítica pode ser definida como a capacidade do teste de detectar com cuidado o analito específico na presença de factores potencialmente interferentes na matriz da amostra (ex. hemólise, efeitos de tratamentos da amostra) ou de reacções cruzadas com analitos potencialmente interferentes.

Dado que, neste caso particular, a quantidade de substância a testar é gerada *in vitro* e o branco da amostra é subtraído, a especificidade real do anticorpo anti-angiotensina I não é crítica.

Entretanto, mais do que as reações cruzadas por péptidos circulantes similares à angiotensina, são as interferências das proteínas da amostra (branco da amostra) a limitar a sensibilidade do teste. O branco da amostra inclui as contribuições de proteínas similares à angiotensina e da angiotensina I em circulação e produzida pela acção da renina mesmo com baixas temperaturas, do momento da colheita do sangue ao momento do ensaio.

Interferências. Estudos controlados de substâncias ou condições potencialmente interferentes demonstraram que o desempenho do ensaio não é afectado por lipemia (até a 500 mg/dL de triglicéridos), bilirrubinemia (até a 20 mg/dL de bilirrubina). Os valores de angiotensina I obtidos com as amostras que contêm 1000 mg/dL de hemoglobina resultam cerca de 10% abaixo dos obtidos com as amostras normais.

Reações cruzadas. As percentagens de reações cruzadas por alguns péptidos similares à angiotensina, calculadas segundo Abraham, mostram a especificidade do anticorpo usado.

- Angiotensina I	100%
- Angiotensina II	< 0,1%
- Heptapéptido, hexapéptido	<< 0,02%

9.2. Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica também pode ser expressa como o limite de detecção, ou seja, a quantidade mínima de analito específico detectável pelo teste. O limite de detecção é de 0,20 ng/mL com um limite de confiança de 95%. Este foi calculado como a concentração aparente de analito que pode ser distinguida do calibrador zero, isto é, dois desvios padrão abaixo do zero.

9.3. Precisão

Diferentes grupos de amostras, que contêm diferentes níveis de PRA, foram testados para determinar a repetibilidade e a reprodutibilidade do teste (isto é, a variabilidade intra e inter-ensaio).

Repetibilidade	A	B	C
Número de determinações	10	10	10
Média (ng/mL/hora)	2,3	8,8	13,5
Desvio padrão	0,17	0,48	1,34
Coefficiente de variação (%)	7,5	5,4	9,9

Reprodutibilidade	A	B	C
Número de determinações	10	10	10
Média (ng/mL/hora)	2,6	8,6	13,0
Desvio padrão	0,20	0,70	1,50
Coefficiente de variação (%)	7,7	8,1	11,5

9.4. Exactidão

A exactidão do teste foi controlada mediante os testes de diluição e recuperação.

Teste de diluição. Foram testadas diluições em série de duas amostras de plasma que contêm uma concentração elevada de angiotensina I efectuadas no calibrador zero.

Diluição	Concentração esperada, ng/mL	Concentração medida, ng/mL	% Recuperação
puro	–	17,5	–
1:2	8,75	8,6	98,3
1:4	4,38	4,5	102,9
1:8	2,19	2,3	105,1
1:16	1,09	1,1	100,6
puro	–	8,5	–
1:2	4,25	4,4	103,5
1:4	2,13	2,2	103,5
1:8	1,06	1,1	103,5
1:16	0,53	0,5	94,1

Teste de recuperação. Foram testadas duas amostras de plasma que contêm uma baixa concentração de angiotensina I, quer puras, quer após ter adicionado quantidades crescentes de angiotensina I.

Concentração adicionada, ng/mL	Concentração esperada, ng/mL	Concentração medida, ng/mL	% Recuperação
–	–	11,2	–
1,5	7,1	7,0	98,6
5,0	10,6	10,7	100,9
25,0	30,6	30,0	98,0
–	–	15,6	–
1,5	9,3	9,1	97,8
5,0	12,8	12,2	95,3
25,0	32,8	30,7	93,6

10. LIMITAÇÕES DO TESTE

O significado clínico da determinação da actividade da renina plasmática pode ser invalidado se efectuado em doentes não mantidos em condições controladas de postura, de introdução de sódio e potássio ou aos quais foram subministrados medicamentos como diuréticos, clonidina, agentes beta-bloqueadores, estroprogestinas, vasodilatadores periféricos, que alteram a secreção da renina.

O diagnóstico não deve basear-se no resultado dum único teste, mas deve ser determinado conjuntamente com outros dados clínicos e meios de diagnóstico, bem como em associação com o parecer do médico.

Contaminações bacterianas ou ciclos repetidos de congelação e descongelação das amostras podem afectar os resultados do teste.

Para obter resultados fiáveis, é necessário seguir de maneira correcta as instruções de uso e possuir uma adequada formação técnica. Em especial, é essencial uma boa precisão na preparação e distribuição dos reagentes e na aspiração da mistura de incubação.

Resultados não reprodutíveis podem ser devidos a erros de execução, tais como:

- troca das tampas dos frascos
- uso da mesma ponta para distribuir soluções ou amostras diferentes
- frascos deixados abertos durante um longo período de tempo
- exposição dos reagentes ou amostras ao calor intenso ou a fontes de contaminação bacteriana
- aspiração inadequada da mistura de incubação
- contaminação dos rebordos dos tubos com o marcador ou com as amostras
- oscilações casuais ou manutenção inadequada do contador gama
- troca de reagentes de diferentes lotes.

11. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Os componentes do dispositivo contêm azida sódica como conservante. Dado que a azida sódica pode formar azidas de chumbo ou de cobre explosivas nos tubos, é aconselhável deixar fluir água com abundância nas descargas após a eliminação de soluções que contêm azida sódica (Directiva 99/45/EC).

R 22 – Nocivo por ingestão.

R 31 – Em contacto com ácidos liberta gases tóxicos.

S 28 – Após contacto com a pele, lavar imediata e abundantemente com água.

S 45 – Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

PMSF (Directiva 99/45/EC):

R 22 – Nocivo por ingestão.

R 36/38 – Irritante para os olhos e pele.

S 45 – Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

Etanol (Directiva 99/45/EC):

R 11 – Facilmente inflamável.

S 7 – Manter o recipiente bem fechado.

S 16 – Manter afastado de qualquer chama ou fonte de ignição. Não fumar.

Todas as unidades de soro e plasma utilizadas para produzir os componentes deste dispositivo foram testadas para a presença de HBsAg, anti-HCV e anti-HIV-1/2 e os resultados encontrados foram não reactivos. Contudo, como nenhum método pode oferecer segurança absoluta de que agentes patogénicos estejam ausentes, todas as amostras de origem humana devem ser consideradas potencialmente infecciosas e manuseadas com cuidado.

12. REGRAS DE SEGURANÇA

- Não coma, beba, fume ou aplique cosméticos durante a execução do teste.
- Não pipete as soluções com a boca.
- Evite o contacto directo com todos os materiais potencialmente infecciosos usando equipamentos de protecção como luvas descartáveis, óculos e aventais. Lave bem as mãos no final de cada teste.

- Evite salpicos ou formação de aerossóis. Qualquer reagente derramado deve ser lavado com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% e tratado como material residual potencialmente infeccioso.
- Todas as amostras, os reagentes biológicos e os materiais utilizados nos testes devem ser considerados potencialmente capazes de transmitir agentes infecciosos. Por isso, os resíduos devem ser eliminados conforme as regras emitidas pelos órgãos autorizados que administram o laboratório e conforme o regulamento específico de cada país. O material descartável deve ser incinerado, os resíduos líquidos devem ser descontaminados com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% no mínimo durante meia hora. Qualquer material reutilizado deve ser autoclavado usando a abordagem de sobredestruição (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). Em geral, uma hora a 121°C é considerado um tempo de esterilização adequado, mas os utilizadores devem verificar a eficiência do seu sistema de descontaminação através de validação e utilização rotineira de indicadores biológicos.

13. REGRAS BÁSICAS DE SEGURANÇA CONTRA RADIAÇÃO

Reagentes com Iodo-125

Este kit contém material radioactivo que não excede 2,1 µCi (76 kBq) de Iodo-125. Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e usadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseamento e eliminação deste material.

Para médicos ou instituições que recebam rádio-isótopos sob uma licença geral:

Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática da medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínico in vitro que não envolvam administração interna ou externa do material, ou a radiação deste para seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos do estado com o qual a Comissão chegou a acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve ser limitado a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve ser limitado apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo por via oral.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.
5. As áreas onde possam ocorrer fugas devem ser limpas e em seguidas lavadas com detergente álcali ou solução de descontaminação radiológica. Qualquer vidro usado deve ser enxaguado completamente em água antes de lavar qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença específica:

A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições de sua licença específica.

ATENÇÃO: O símbolo de radioactividade impresso na embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indicam a quantidade real de radioactividade na data de calibragem enquanto a embalagem indica a radioactividade teórica no kit.

ESQUEMA DO TESTE

- 1 - RECONSTITUA OS REAGENTES.
- 2 - EXECUTE A GERAÇÃO DE ANGIOTENSINA I POR 90 MIN A 37°C EM TUBOS NÃO REVESTIDOS.
- 3 - IDENTIFIQUE OS TUBOS REVESTIDOS EM DUPLICADO PARA O TESTE RIA.
- 4 - DISTRIBUA OS REAGENTES DE ACORDO COM O ESQUEMA ABAIXO E AGITE A MISTURA DE INCUBAÇÃO:

REAGENTES	TUBOS	CAL 0-5	AMOSTRAS E BRANCOS
CALIBRADORES		50 µL	–
AMOSTRAS		–	50 µL
MARCADOR		500 µL	500 µL

- 5 - INCUBE DE 3 A 24 HORAS À TEMPERATURA AMBIENTE.
- 6 - ASPIRE COM CUIDADO A MISTURA DE INCUBAÇÃO.
- 7 - MEÇA A RADIOACTIVIDADE DOS TUBOS.

ANGIOTENSIN I RADIOIMMUNASSAY KÉSZLET

Eljárás plazma renin aktivitás (PRA) mérésére kvantitatív angiotensin I meghatározással humán plazmából

Csak in vitro alkalmazásra

1. BEVEZETÉS

A renin, egy megközelítőleg 40,000 dalton molekulatömegű proteolitikus enzim, amely a vese juxtaglomeruláris sejtjeiből szabadul fel. Egy enzim, az angiotensinogén egy megközelítőleg 1,300 dalton molekula tömegű decapeptid formát, az angiotensin I-et hasítja le belőle. Ez a polipeptid egy újabb átalakító enzim (ACE) által irányított hidrolízis során alakul át biológiailag aktív oktapeptid angiotensin II-vé II.

Az antiangiotensin-renin rendszer hormonális produktumának, az angiotensin II-nak, rendkívül rövid az in vivo felezési ideje, de ez a leghatásosabb ismert vazopresszor; legfőbb feladatai a vazokonstriktió, a szimpatikus idegrendszer stimulálása és a mellékvese aldoszteron szekréciójának stimulálása.

Mivel az angiotensin I szintje közvetlenül reprezentálja a plazma renin aktivitását, a plazma renin aktivitás meghatározása széles körben alkalmas a renin-angiotensin rendszer betegségeinek feltérképezésére. A plazma renin aktivitás mérése (PRA) magas vérnyomásban szenvedő betegek esetén rendkívül fontos az elsődleges és másodlagos aldoszteronizmus differenciál diagnosztikájában.

A renin szekréciót különböző faktorok befolyásolják, melyek közül gátló hatásúak a plazma angiotensin II és ADH szintje, a megnövekedett nátrium- és kálium visszatartás és a megnövekedett renális perfúziós nyomás. Ellentétben a nátrium- és kálium kiürülése, csökkent renális perfúziós nyomás, a szimpatikus idegrendszer aktivitása mind-mind a renin szekréciót fokozza.

2. MEGHATÁROZÁS ELVE

Az angiotensin I radioimmunassay a renin aktivitás meghatározásából áll. Az eljárás fő lépései a következők:

- angiotensin I generálása plazmában 37°C-os inkubációval olyan feltételek között, melyek meggátolják az angiotensin I degradációját (jelen lévő PMSF enzim inhibitor) és alkalmasak a renin aktivitás szemléltetésére
- angiotensin I bevonatos csöves radioimmunoassay két aliquot-tal ugyanazon mintából: egy 37°C-on inkubált, generált és egy nem inkubált (minta vak)

A radioimmunassay alapját a jelölt angiotensin I és a kalibrátorkban, illetve mintákban lévő angiotensin I fix és limitált számú antitest kötőhelyért folytatott versengése képezi. A RIA inkubációját követően a megkötődött jelölt angiotensin I mennyisége fordítottan arányos a kalibrátorok és minták jelöletlen angiotensin I koncentrációjával. A metodika B/F szeparációt alkalmaz, melynek alapját az antitest-bevonatos csövek képezik, amelyekben az antitest a cső falához van kötve.

3. A KÉSZLET TARTALMA

Bevonatos csövek	100
¹²⁵ I-el jelölt angiotensin I	2 üveg
Angiotensin I kalibrátorok	6 üveg
Kontroll plazma	1 üveg
Generáló puffer	1 üveg
Enzimatis inhibitor (PMSF)	1 üveg
Csővek száma	100

TÁROLÁS: Kézhez vétel után 2-8°C-on tárolandó. Tilos lefagyasztani. A felbontatlan készlet reagensei megfelelő tárolás mellett lejárati ideig eltartható. A készlet három assay futtatására alkalmas a gyártó által ajánlott körülmények között tárolva.

A reagensek lejárati idő után nem használhatóak. A készlet külső címkéjén feltüntetett lejárati idő a tracer lejárati idejével egyezik meg. Valamennyi komponens lejárati ideje a megfelelő üveg címkéjén van feltüntetve.

Az üveg tartalmának feloldásakor kerülje a habképződést.

Különböző sorozatokból származó reagensek összekeverése tilos.

3.1. Bevonatos csövek

Valamennyi cső belső felszíne nyúlban termeltetett biotinilált angiotensin I IgG-vel van bevonva.

Használat előtt a felbontatlan dobozokban hozza szobahőmérsékletre a bevonatos csöveket, hogy elkerülje a nedvességgel történő kondenzációt.

Zárja le a tökéletesen a fel nem használt csöveket a dobozban. Különböző sorozatokból származó bevonatos csövek nem keverhetőek.

3.2. ¹²⁵I-tel jelölt ileu-5-angiotensin I (piros): liofilizált reagens

Valamennyi üveg ¹²⁵I –tel jelölt hormont, BSA-t, foszfát puffert, stabilizátort, tartósítót és semleges piros színezéket tartalmaz. Radioaktivitása 81 kBq (2.2 µCi), vagy ennél kisebb a kalibráció idején.

Oldja fel valamennyi üveg tartalmát 26 mL desztillált vízben. A kapott oldat kisebb részekre osztva, fagyasztva (–20°C vagy az alatt) tárolható.

3.3. Ilev-5-angiotensin I kalibrátorok: liofilizált reagens

Valamennyi üveg emelkedő mennyiségű, angiotensin I-t, BSA-t, foszfát puffert és tartósítót tartalmaz. Oldja fel valamennyi üveg tartalmát 1 mL desztillált vízben. A kapott oldatok 0 - 0.3 - 1 - 3 - 10 - 50 ng/mL koncentrációjúak és aliquotok-ra fagyaszttva tárolhatóak (-20°C, vagy az alatt). A készlet kalibrátorai felcserélhetőek páciens mintákkal az *in vitro* diagnosztikai teszt reagenseinek és a gyártó által előírt felhasználó utasítás felhasználásával.

3.4. Kontroll plazma: liofilizált reagens

Az üveg humán plazma-t és tartósítót tartalmaz. Minden egyes kontroll koncentrációtartományra jelentésre kerül az elemzési igazoláson, és jelzi azokat a DiaSorin által a kontrollértékek számára megállapított határértékeket, amelyek megbízható assay-futtatások során szerezhetőek meg. Oldja fel az üveg tartalmát 2 mL lehűtött desztillált vízben, vigyázva arra, hogy annak a hőmérséklete ne haladja meg a 4°C-ot.

A kapott oldat kisebb részekre osztva, fagyaszttva (-20°C vagy az alatt) tárolható.

A kontroll mintaként kezelendő, a meghatározás előtt az angiotensin I-et generálni kell 90 percig 37°C-on.

3.5. Generáló puffer (kék): felhasználásra kész

Az üveg 4 mL citrát puffert, stabilizátort, tartósítót és semleges kék színezéket tartalmaz.

3.6. Enzimátikus inhibitor (PMSF): felhasználásra kész

Az üveg 1.0 mL 5%-os fenil-metil-szulfonil fluorid (PMSF) (R 23/24/25, S 36, S 45) etanol oldatot tartalmaz (R 11, S 7, S 16).

Ha 2-8°C-on kristályok jelennek meg, melegítse a PMSF oldatot 37°C-ra.

4. SZÜKSÉGES ESZKÖZÖK ÉS ANYAGOK, MELYEKET A KÉSZLET NEM TARTALMAZ

- Desztillált, vagy deionizált víz.
- Üvegeszközök.
- Egyszer használatos polisztrén csövek.
- Teszt cső tartó.
- Mikropipetta eldobható hegyekkel (10, 50, 200, 500 µL) (10, 50 µL: pontosság ± 3%, precizitás 2%; 200, 500 µL: pontosság ± 2%, precizitás 1%).
- Vortex mixer.
- Termosztálható hőmérséklet szabályozós vízfürdő 37° ± 1°C választási lehetőséggel.
- Az inkubáló keverék leszívására alkalmas eszköz.
- ¹²⁵I mérésére alkalmas gamma számláló (számláló ablak beállítása: 15-80 keV – számláló teljesítménye: 70% - mérés ideje: 1 perc). Ha a számláló teljesítménye 60% alatt van, a mérési időt 2 percre kell növelni.

5. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

Mintavétel

A körültekintés a beteg előkészítésénél és a minta kezelésénél hangsúlyozottan ajánlott. A vér vételére előhűtött csövek alkalmasak, antikoagulásként nátrium-EDTA alkalmazható

A vér minta nem vehető heparint, mint antikoagulást tartalmazó csöbe, mert az interferenciát okoz az angiotensin I generációnál. Ellenben az EDTA ajánlott, mint előnyös használható antikoaguláns, mert egyidejűleg részt vesz az átalakító enzim gátlásában.

A plazma nyeréshez a mintákat hidegen kell tartani és hidegen kell centrifugálni 2000 X g*-on. A partikulumokat, turbid részeket, lipémiát, vagy vörösvértest törmelékeket tartalmazó részeket szűrővel, vagy centrifugálással el kell távolítani. Nagy mértékű hemolízist, vagy lipémiát tartalmazó mintákat, valamint kívülről mikrobiológiai fertőzésnek kitétt mintákat tilos feldolgozni. Ha az assay végrehajtása nem történik meg azonnal, a mintákat aliquotokra kell osztani és azokat felhasználásig fagyaszttóban kell tárolni (-20°C, vagy az alatt). Ha a minta fagyaszttva volt, a felolvasztott mintát alaposan keverje össze, mielőtt mérné, vigyázva arra, hogy azok hőmérséklete ne haladja meg a 4°C-ot. Kerülje az ismételt fagyaszttás-olvasztást.

Angiotensin I generálás

Angiotensin I generációt pH 6.0 alatt kell elvégezni optimált feltételek mellett az alacsony aktivitású mintákra nézve elvárt jobb szenzitivitás, valamint a legrövidebb generálási időt kell alkalmazni. A generálási tényezők kiválasztásánál a legkisebb minta hígítást válassza, hogy a hígítási effektust a lehető leginkább redukálja az angiotensin I kinetikájában.

- Mérje a következő reagenseket jégfürdőn tartott **nem-bevonatos** csövekbe, **pontosan betartva az idevonatkozó utasításokat:**

- . 500 µL minta
- . 10 µL PMSF
- . 50 µL generáló puffer.

- A csövek tartalmát Vortex-el keverje össze és mérjen 200 µL-t minden mintából egy másik sorozat nem bevonatos csöbe.

- Inkubálja a második sorozat csövet 90 percig 37°C-os hőmérsékletszabályozós vízfürdőn, miközben az első sorozatot a jégfürdőn tartja (minta vak).

Az ajánlott generálási idő egy átlagos idő, amely a PRA meghatározáshoz fiziopatológias körülmények kötött elegendő. Az ennél magasabb, vagy alacsonyabb PRA értékekhez az időt nyújtani, vagy csökkenteni kell (Ábra. 1).

- A 37°C-os inkubációt követően a generált csöveket azonnal helyezze jégfürdőre.

6. MEGHATÁROZÁS FOLYAMATA

Hozza valamennyi reagenst szobahőmérsékletre (20-25°C) mérés előtt. Végezze a méréseket duplikátumban A kalibrátorokat közvetlenül kell mérni a RIA mérés során, nem szükséges az angiotensin I generálás és valamennyi minta futtatásnál futtatni. A kalibrátorok és minták kezelése és inkubációja teljes mértékben megegyezik.

Minden assay-ben leírt lépés betartandó és késedelem nélkül elvégzendő.

Tiszta, egyszer használatos hegyet használjon mind a kalibrátorok, mind a minták beméréséhez.

- A reagenseket a bevonatos csövek aljára mérje be. Dolgozzon a következő terv alapján:

	Csővek	Kalibrátorok	Minták & vakok
Reagensek		0-5	
Kalibrátorok		50 µL	–
Minták		–	50 µL
Tracer		500 µL	500 µL

- **Keverje össze** a csövek tartalmát Vortex-el és **inkubálja** 3-24 órán keresztül szobahőmérsékleten.
- Alaposan **szívja** le az inkubált elegyet. *Győződjön meg róla, hogy a leszívó hegy érinti a cső alját és valamennyi folyadék leszívásra került. Az el nem távolított oldat rontja a reprodukálhatóságot és hamis eredményhez vezethet. Nem szabad színezéket látni a csőben.*
- **Mérje a radioaktivitást** a csövekben.

7. EREDMÉNYEK SZÁMÍTÁSA

Számolja ki valamennyi cső-pár átlag beütésszámát. Számolja ki a B/Bo hányados értékét valamennyi kalibrátorra és ismeretlen mintára vonatkozóan a következő képlet alapján:

$$B/Bo\% = \frac{\text{Kalibrátor, vagy minta átlag beütésszáma}}{\text{Nulla kalibrátor átlag beütésszáma}} \times 100$$

Ábrázolja semi-log milliméterpapíron a kalibrátorokhoz tartozó átlagos százaléktértéket az ordináta-(y) tengelyen a hozzá tartozó ng/mL-ben megadott angiotensin I koncentráció függvényében (abszcissza, x- tengely). A kalibrációs görbe meghatározásra került (Ábra. 2). A plazma renin aktivitás (PRA) számítása ng generált angiotensin I/mL/óra mértékegységben a következő séma alapján történik:

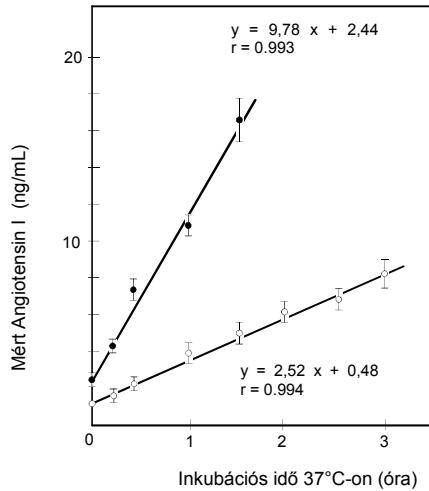
- közvetlenül olvassa le a kalibrációs görbéről a generált angiotensin I koncentrációkat valamennyi minta esetén, mind a 37°C-on inkubált mintákra, mind a minta vakokra (jégfürdőn tartott) nézve.
- vonja ki a mintavak értékét a minta értékéből.
- szorozza meg az értéket 1.12, mely az 1:1.12 minta hígítást korigálja.
- ossza el a kapott koncentrációt a generálási idővel (óra):

$$PRA = \frac{(\text{ng } 37^{\circ}\text{C} - \text{ng } 4^{\circ}\text{C}) \times 1.12}{\text{Inkubáció ideje}} = \text{ng/mL/óra.} \quad (1)$$

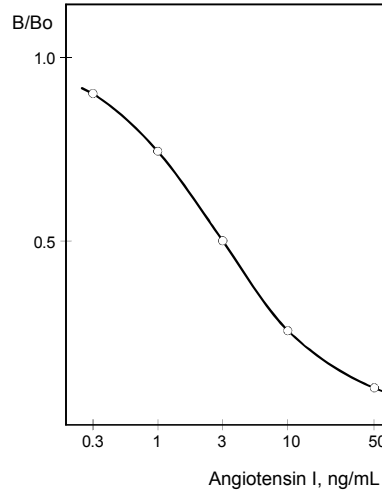
$$*g = (1118 \times 10^{-8})(\text{sugár cm-ben megadva})(\text{rpm})^2$$

A generálási időt 1,5 órának választva a képlet egyszerűsödik (1):

$$\text{PRA} = (\text{ng } 37^{\circ}\text{C} - \text{ng } 4^{\circ}\text{C}) \times 0.747 = \text{ng/mL/óra.}$$



Ábra 1 - Az angiotensin I linearitásának ellenőrzése megnövelt generációs idővel 37°C-on, pH 6.0.



Ábra 2

Számítási példa

A következő adatok csak példaként szolgálnak és nem helyettesíthetők a felhasználó által mért adatokba.

Megnevezés	cpm	B/Bo x 100
Nulla kalibrátor	19,230	100
0.3 ng/mL	17,692	92.0
1 ng/mL	14,519	75.5
3 ng/mL	9,807	51.0
10 ng/mL	5,000	26.0
50 ng/mL	2,115	11.0
Minta vak	17,499	91.0
Minta	9,038	47.0

A kalibrációs görbe interpolációjából és az egyenletről (1) a vizsgált minta plazma renin aktivitása 2.39 ng/mL/óra.

$$\text{PRA} = \frac{(3.5 - 0.3) \times 1.12}{1.5} = 2.39 \text{ ng/mL/óra.}$$

8. VÁRT ÉRTÉKEK

Az alább feltüntetett referencia tartomány csupán 100-150 mEq/24 óra Na bevitelre vonatkozik; minden laboratórium számára ajánlott saját referencia tartomány felállítása.

Generálás pH 6.0 PRA, ng/mL/óra	Gyenge pozitív	Erősen pozitív
	0.2 - 2.8	1.5 - 5.7

9. SPECIFIKUS ANALITIKAI JELLEMZŐK

9.1. Analitikai specificitás

Az analitikai specificitás az assay azon jellemzője, hogy hitelesen képes a specifikus analit jelenlétét kimutatni a potenciális interferáló faktortényezők (pl. antikoaguláns, hemolízis, gyógyszeres kezelés hatása), valamint keresztreakáló analitek között a minta mátrix-ból.

Minthogy az assay-ben in vitro sajátosságos körülmények között kerülnek meghatározásra az anyagok és a minta vak levonásra kerül az aktuális angiotensin I antitest nem kritikus.

Mindamellett, hogy a peptidhez kötött keringő antitest keresztreakciója nem jellemző, a minta proteinek (minta vak) interferenciája az assay szenzitivitásában korlátokat jelenthet.

Interferencia. Az ellenőrző mérés során potenciális interferáló anyagok és interferencia tényezők kerültek vizsgálatra és az assay-re nem mutatott hatást a lipémia (500 mg/dL triglicerid koncentrációig), és a bilirubinémia (20 mg/dL bilirubin koncentrációig).

1000 mg/dL haemoglobint tartalmazó minta Angiotensin I koncentrációja 10 %-al alacsonyabb a haemoglobint nem tartalmazó minta Angiotensin I koncentrációjánál.

Keresztreakciók. A peptidhez kötött angiotensin százalékos keresztreakciója, Abraham szerint mutatja a használt antitest specificitását.

- Angiotensin I 100%
- Angiotensin II < 0.1%
- Heptapeptid, hexapeptid << 0.02%

9.2. Analitikai szenzitivitás

Az analitikai szenzitivitás a detektálás határaként fejezhető ki, mely nem más mint a specifikus analit minimális mennyisége, amely az assay-val kimutatható. A detektálás határa 0.20 ng/mL 95%-os konfidencia értékénél. Ez az analit koncentráció kiszámítható, mint a nulla kalibrátortól két standard devianciával eltérő érték.

9.3. Precizitás

Különböző minta pool-ok, különböző PRA értékei kerültek mérésre az assay ismételtetésének és reprodukálhatóságának vizsgálatára (sorozaton belüli és sorozatok közötti variabilitás).

Ismételhetőség	A	B	C
Meghatározások száma	10	10	10
Átlag (ng/mL/óra)	2.3	8.8	13.5
Standard deviancia	0.17	0.48	1.34
Variációs koefficiens (%)	7.5	5.4	9.9

Reprodukálhatóság	A	B	C
Meghatározások száma	10	10	10
Átlag (ng/mL/óra)	2.6	8.6	13.0
Standard deviancia	0.20	0.70	1.50
Variációs koefficiens (%)	7.7	8.1	11.5

9.4. Megbízhatóság

Az assay megbízhatósága hígítási és visszanyerési teszttel ellenőrizhető.

Hígítási teszt. Két magas angiotensin I koncentrációjú plazma minta került mérésre nulla kalibrátorral történő sorozathígítást követően.

Hígítás	Várt koncentráció, ng/mL	Mért koncentráció, ng/mL	% Visszanyerés
hígítatlan	–	17.5	–
1:2	8.75	8.6	98.3
1:4	4.38	4.5	102.9
1:8	2.19	2.3	105.1
1:16	1.09	1.1	100.6
hígítatlan	–	8.5	–
1:2	4.25	4.4	103.5
1:4	2.13	2.2	103.5
1:8	1.06	1.1	103.5
1:16	0.53	0.5	94.1

Visszanyerési teszt. Két alacsony angiotensin I koncentrációjú plazma került mérésre növekvő mennyiségű angiotensin I hozzáadását követően.

Hozzáadott koncentráció, ng/mL	Várt koncentráció, ng/mL	Mért koncentráció, ng/mL	% Visszanyerés
–	–	11.2	–
1.5	7.1	7.0	98.6
5.0	10.6	10.7	100.9
25.0	30.6	30.0	98.0
–	–	15.6	–
1.5	9.3	9.1	97.8
5.0	12.8	12.2	95.3
25.0	32.8	30.7	93.6

10. A MEGHATÁROZÁS KORLÁTAI

Klinikailag nem szignifikáns, hibás eredményt kaphatunk PRA assay-val, amennyiben a beteg nem tartja kontroll alatt a nátrium és kálium bevitelét, vagy diuretikus, chlonidin, béta-blokkoló ágenszt tartalmazó, estroprogestogén-t, perifériás értágítót szed, amely befolyásolja a renin szekréciót.

A diagnózis felállításához nem elegendő egyetlen teszt eredménye, figyelembe kell venni a klinikai leleteket és más diagnosztikai vizsgálatokat a klinikai döntéshozatal során.

A bakteriális kontamináció, vagy a minta többszöri olvasztás-fagyasztása befolyásolja az eredményeket.

Szakképzett személyzet és az utasítások teljes körű betartása szükséges a megbízható eredmények eléréséhez. Különösen fontos a pontos pipettázás és a tökéletes leszívás és mosás.

Nem reprodukálható eredmények eredhetnek a következő hibaforrásokból:

- az üvegek kupakjainak összecserélése
- ugyanazon hegy használata különböző üvegekből, vagy mintákból történő beméréskor
- hosszan nyitva tartott üvegek
- magas hőmérsékletnek, vagy bakteriális kontaminációnak kitett reagensek, vagy minták
- inkubációt követően nem megfelelő a csövek leszívása és mosása
- a cső peremének mintával, vagy tracer-el történő beszennyezése
- a gamma számláló nem megfelelő kezelése
- nem azonos sorozatból származó reagensek keverése.

11. FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK

A készlet néhány reagense sodium-azid-ot tartalmaz tartósítóként. A sodium-azid ólom és réz tartalmú vízvezetékekkel reakcióba lépve robbanásveszélyes fém-azidokat képez, ezért a hulladékot bő vízzel eressze le a felszabaduló azidok kitapadásának megakadályozására (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Lenyelése káros.

R 31 – Savakkal kapcsolatba lépve toxikus gázok szabadulnak fel.

S 28 – Bőrrel történő érintkezését követően azonnal bő vízzel mossa le.

S 45 – Baleset, vagy rosszullét esetén azonnal forduljon orvoshoz.

PMSF (Council Directive 99/45/EC):

R 22 – Lenyelése káros.

R 36/38 – Irritálja a szemet és a bőrt.

S 45 – Baleset, vagy rosszullét esetén azonnal forduljon orvoshoz.

Etanol (Council Directive 99/45/EC):

R 11 – Nagyon tűzveszélyes!

S 7 – Tartsa szorosan záródó konténerben.

S 16 – Tartsa távol mindennemű tűzforrástól. Tilos a dohányzás.

Minden szérum és plazma donor egység, amelyet a készlet tartalmaz, ki lett vizsgálva és negatív eredményt adott HBsAg-re, HCV antitestre és HIV 1/2 antitestre nézve. Bár az ellenőrzés nagy pontossággal történik nem garantálható, hogy valamennyi fertőző tényező kimutatásra kerül. A készlet tartalmaz olyan humán eredetű anyagokat is amelyek nem esnek tesztelés alá, a humán eredetű anyagokat a potenciális infekciók figyelembevételével, megfelelő elővigyázatossággal kell kezelni.

12. BIZTONSÁGI ELŐÍRÁSOK

- Tilos a laboratóriumban enni, inni, dohányozni és kozmetikai szereket használni.
- Tilos az oldatok szájjal történő pipettázása.
- Az anyagokat potenciális infektológiai forrásként kell kezelni, megfelelő védőruházat, például laboratóriumi köpeny, védőszemüveg, kesztyű segítségével kerülni kell velük a direkt kontaktust. Minden munkafolyamat végén alaposan mosson kezet.
- Kerülje a kicsapódást és az aeroszol képződést. Valamennyi kilöttyent reagenst 5%-os Na-hipoklorittal mossa fel és kezelje potenciális fertőzőforrásként.

- Az assayben használt valamennyi mintát, biológiai reagenst és anyagokat potenciális infektológiai ágensként kell kezelni. Ezért ezeket az anyagokat a mindenkor szabályoknak és irányelveknek megfelelően kell kezelni a laboratórium illetékesek és az országos szabályok által előírtak szerint. Az egyszer használatos anyagokat el kell égetni, a folyékony hulladékot pedig dekontaminálni kell 5%-os végkoncentrációjú Na-hipoklorittal legalább fél órán keresztül. Minden újrahasználató tárgyat autoklavozni kell „mindent előlő” beállítással (USP 24, 2000, p. 2143). Minimum 1 óra 121°C rendszerint elegendő, de a felhasználónak gondoskodnia kell a dekontaminálási ciklus hatékonyság ellenőrzéséről rutinban is használt, érvényes biológiai indikátorral.

13. ALAPSZABÁLYOK RADIÁKTÍV ANYAGOK KEZELÉSÉRE

I-125 TARTALMÚ REAGENSEK

Ez a készlet olyan I-125 tartalmú anyagokat tartalmaz, melyek radioaktivitása nem haladja meg a 2.1 µCi (76 kBq) értéket. Helyes előkészítés és megfelelő laboratóriumi gyakorlat szükséges az anyagok tárolásánál, kezelésénél és a hulladékkezelésnél.

Egyetemes szabályok radioizotópok kezeléséhez:

Ezeket a radioaktív anyagokat csak orvosok, vagy állatorvosok szerezhetik be, birtokolhatják és használhatják humán és állat gyógyászatban, klinikai laboratóriumokban, vagy kórházakban kizárólag in vitro klinikai, vagy laboratóriumi tesztekben, melyek nem foglalják magukban a humán, illetve állati szervezet külső, vagy belső kezelését, arra irányuló sugárzást. Ezen termékek beszerzése, birtoklása, használata, szállítása a U.S. Nuclear Regulatory Commission szabályozása alá esik.

1. A radioaktív anyagokat körülhatárolt, speciálisan jelölt területen kell tárolni.
2. A radioaktív anyagokhoz csak arra jogosult személyek férhetnek.
3. Tilos a radioaktív anyagok szájjal történő pipettázása.
4. A radioaktív munkához kijelölt területen enni és inni tilos.
5. A területet, ahová radioaktív anyag lóttyn ki, fel kell törölni, majd alkali detergenssel, vagy radioaktivitást dekontamináló oldattal kell felmosni. Az üvegedényeket alaposan ki kell öblíteni vízzel mielőtt más laboratóriumi edénnyel együtt kerülne mosásra.

A radioaktív anyagok kezelésénél a következő speciális szabályok érvényesek:

A radioaktív anyagok kezelésének, használatának, szállításának és hulladékkezelésének szabályozása saját szabályozás alá esik.

FIGYELMEZTETÉS: A csomagoláson feltüntetett radioaktivitás némileg eltérhet a doboz és a tracer címkéjén feltüntetett értéktől. A dobozon és a tracer címkéjén feltüntetett érték a csomag kalibrációjának napján aktuálisan mért értéket mutatja, míg a csomagolás leírása a készlet teoretikus radioaktivitását tartalmazza.

A MÉRÉS SÉMÁJA

- 1- REAGENSEK FELOLDÁSA.
- 2- ANGIOTENSIN I GENERÁLÁS 90 PERCIG, 37°C-ON NEM-BEVONATOS CSÖVEKBEN.
- 3- RIA ASSAY BEVONATOS CSÖVEK JELÖLÉSE DUPLIKÁTUMBAN.
- 4- REAGENSEK BEMÉRÉSE A KÖVETKEZŐ SÉMA SZERINT, MAJD AZ INKUBÁLANDÓ ELEGY KEVERÉSE:

REAGENSEK	CSÖVEK	KAL 0-5	MINTÁK ÉS VAKOK
KALIBRÁTOROK		50 µL	–
MINTÁK		–	50 µL
TRACER		500 µL	500 µL

- 5- INKUBÁCIÓ 3-24 ÓRÁN KERESZTÜL SZOBAHŐMÉRSÉKLETEN.
- 6- AZ INKUBÁCIÓS ELEGY ÓVATOS LESÚVÁSA.
- 7- A CSÖVEK RADIOAKTIVITÁSÁNAK MÉRÉSE.

RADIOIMUNOANALYTICKÁ SOUPRAVA ANGIOTENSIN I

Postup měření aktivity reninu v plazmě (PRA) kvantitativním stanovením angiotensinu I ve vzorcích lidské plazmy

Určeno pouze pro diagnostické použití in vitro

1. ÚVOD

Renin, proteolytický enzym s molekulární hmotností cca 40000 daltonů, je uvolňován juxtaglomerulárními buňkami ledvin. Tento enzym se váže na svůj substrát angiotensinogen za vytvoření dekapeptidu angiotensinu s molekulární hmotností cca 1300 daltonů. Tento polypeptid je dále hydrolyzován konvertujícím enzymem (ACE) na biologicky aktivní oktapeptid angiotensin II.

Angiotensin II, hormonální produkt systému renin-angiotensin, má extrémně krátký eliminační poločas in vivo, ale je to nejsilnější známý vazopresor; jeho hlavními účinky jsou vazokonstrikce, stimulace sympatického nervového systému a stimulace vylučování aldosteronu nadledvinkami.

Protože hodnoty angiotensinu I jsou přímým důsledkem aktivity reninu v plazmě, stanovení aktivity reninu v plazmě bylo všeobecně přijato k vyhodnocování systému renin-angiotensin při chorobných stavech. Měření aktivity reninu v plazmě (PRA) u hypertoniků je důležitá pomůcka v diferenciální diagnostice primárního a sekundárního aldosteronismu.

Vylučování reninu je ovlivňováno různými faktory; je potlačováno zvýšenou hladinou angiotensinu II a ADH v plazmě, zvýšenou hladinou sodíku a retencí draslíku a zvýšeným perfuzním tlakem ledvinného oběhu. Naopak nedostatek sodíku a draslíku, snížený perfuzní tlak ledvinného oběhu a aktivita sympatického nervového systému má za následek zvýšené vylučování reninu.

2. PRINCIP ANALÝZY

Měření aktivity reninu sestává z radioimunoanalýzy angiotensinu I. Hlavní kroky této analýzy jsou:

- generování angiotensinu I ve vzorcích plazmy během inkubace při 37°C při podmínkách, které zabraňují degradaci angiotensinu I (přítomnost enzymatického inhibitoru PMSF) a jsou považovány za nejvhodnější pro aktivitu reninu;
- radioimunoanalýza zkumavky s povlakem angiotensinu I ve dvou poměrných dílech stejného vzorku, z nichž jeden je inkubován při 37°C pro generování a druhý inkubován není (blank vzorek).

Princip imunoanalýzy je založen na kompetici mezi značeným angiotensinem I a angiotensinem I obsaženým v kalibrátorech nebo ve vzorcích, které se mají analyzovat, o obsazení pevného a omezeného počtu vazebných míst protilátek. Po inkubaci RIA je množství označeného angiotensinu I navázaného na protilátky nanesené na stěnách zkumavky nepřímě úměrné koncentraci neoznačeného angiotensinu I přítomného v kalibrátorech nebo ve vzorcích. Přijatá metoda separace B/F je založena na zkumavkách s nanesenými protilátkami, kde protilátka je nanášena na stěnách zkumavky.

3. REAGENS DODANÁ V SOUPRAVĚ

Zkumavky s nanesenou vrstvou	100
Angiotensin značený ¹²⁵ I	2 lahvičky
Kalibrátory s angiotensinem I	6 lahviček
Kontrolní plazma	1 lahvička
Vyvíjecí pufr	1 lahvička
Enzymatický inhibitor (PMSF)	1 lahvička
Počet lahviček	100

UCHOVÁVÁNÍ: Po přijetí je nutno soupravu uchovávat při teplotě 2-8°C. Nezmrazujte. Po otevření jsou reagensy v této soupravě při správném skladování stabilní, dokud neuplyne datum jejich expirace. Tato souprava je určena k provedení 3 analýz za předpokladu, že jsou reagensy skladovány podle pokynů výrobce.

Reagensy nelze použít po uplynutí data expirace. Datum expirace soupravy je uvedeno na vnějším označení a odpovídá datu expirace izotopového indikátoru. Datum expirace jednotlivých komponent je uvedeno na označení příslušné lahvičky.

Při rekonstituci obsahu lahviček míchejte šetrně, aby nedocházelo k napěnění.

Reagensy z různých šarží se nesmí navzájem kombinovat.

3.1. Zkumavky s nanesenou vrstvou

Na vnitřní povrch jednotlivých zkumavek je nanášena vrstva biotinylovaného králičího IgG proti angiotensinu I.

Před použitím zkumavky s nanesenou vrstvou nechejte temperovat při pokojové teplotě, abyste eliminovali kondenzaci vlhkosti. Krabici s nepoužitými zkumavkami pečlivě uzavřete. Nekombinujte navzájem zkumavky s nanesenou vrstvou různých šarží.

3.2. Ileu-5-angiotensin značený ¹²⁵I (červený): lyofilizované reagensy

Každá lahvička obsahuje hormon značený ¹²⁵I, BSA, fosfátový pufr, stabilizátory, konzervační látky a inertní červené barvivo. Radioaktivita je 81 kBq (2,2 μCi) nebo méně na jednu lahvičku k datu kalibrace. Rekonstituujte obsah každé lahvičky přidáním 26 ml destilované vody. Výsledný roztok rozdělte na poměrné díly a skladujte v mrazničce (-20°C nebo méně).

3.3. Kalibrátory s ileu-5-angiotensinem I lyofilizované reagens

Lahvičky obsahují zvyšující se množství angiotensinu I, BSA, fosfátového pufru a konzervačních látek.

Rekonstituujte obsah každé lahvičky přidáním 1 ml destilované vody. Výsledné roztoky obsahují 0 - 0,3 - 1 - 3 - 10 - 50 ng/ml a mají se rozdělit na poměrné díly a skladovat v mrazničce (-20°C nebo méně). *Kalibrátory soupravy demonstrují komutativnost patientských vzorků při použití reagensů a operačních postupů v těchto diagnostických testech in vitro podle doporučení výrobce.*

3.4. Kontrolní plazma: lyofilizované reagens

Lahvička obsahuje lidskou plazmu a konzervační látky. Rozmezí koncentrací každého kontrolního séra je uvedeno na osvědčení o analýze a představuje limity stanovené společností DiaSorin pro hodnoty kontrolních sér, které lze získat pomocí spolehlivých stanovení.

Obsah lahvičky rekonstituujte za použití 2 ml zchlazené destilované vody a přitom dbejte, aby teplota nepřekročila 4°C. Výsledný roztok rozdělte na poměrné díly a skladujte v mrazničce (-20°C nebo méně).

S kontrolní plazmou se musí zacházet stejně jako se vzorkem; angiotensin I je třeba vyvíjet před analýzou po dobu 90 minut při 37°C.

3.5. Vyvíjecí pufr (modrý): reagens připravené k použití

Lahvička obsahuje 4 ml pufrového roztoku citrátu, stabilizátory, konzervační látky a inertní modré barvivo.

3.6. Enzymatický inhibitor (PMSF): reagens připravené k použití

Lahvička obsahuje 1,0 ml 5 % roztoku fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF) (R 23/24/25, S 36, S 45) v etanolu (R 11, S 7, S 16).

Pokud dojde při teplotě 2-8°C ke krystalizaci, zahřejte roztok PMSF na 37°C.

4. POTŘEBNÝ MATERIÁL A VYBAVENÍ, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Destilovaná nebo deionizovaná voda
- Laboratorní sklo
- Polystyrénové zkumavky na jedno použití
- Stojan na zkumavky
- Mikropipety se špičkami na jedno použití (10, 50, 200, 500 µL) (10, 50 µL: správnost ± 3 %, přesnost 2 %; 200, 500 µL: správnost ± 2 %, přesnost 1).
- Třepačka „vortex“.
- Termostatická vodní lázeň schopná udržet teplotu 37° ± 1°C.
- Zařízení k aspiraci inkubačního roztoku.
- Detektor gama záření, citlivý na ¹²⁵I (nastavení detekčního okna: 15-80 keV – účinnost detektoru: 70% – detekční čas: 1 min). Je-li účinnost detektoru nižší než 60 %, detekční čas je nutno prodloužit na 2 min.

5. ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKŮ

Odběr vzorku

Důrazně se doporučuje pečlivá standardizace přípravy pacienta a podmínek odběru. Krev je nutno odebrat do zchlazených zkumavek s přídavkem EDTA jako antikoagulantu.

U vzorků krve se jako antikoagulant nesmí použít heparin, protože ten narušuje vyvíjení angiotensinu I. Naopak EDTA poskytuje tu výhodu, že je nejen vhodným antikoagulantem, ale současně napomáhá potlačení konvertujícího enzymu.

Vzorky je nutno uchovat v chladu a odstředit, také v chladu, při 2000 X g*, aby se izolovala plazma. U vzorků, které obsahují pevné částice, jsou zakalené, lipemické nebo obsahují zbytky erytrocytů, může být před provedením testu nutné čištění filtrací nebo centrifugací. Vysoce hemolyzované nebo lipemické vzorky a vzorky, které obsahují pevné částice nebo zjevnou mikrobiální kontaminaci, nelze pro stanovení použít. Pokud se analýza nebude provádět okamžitě, vzorky je nutno rozdělit na poměrné díly a skladovat v mrazničce (-20°C nebo méně) až do analýzy. Pokud jsou vzorky uchovávány zmrazené, rozmrazené vzorky před provedením testu dobře promíchejte a dbejte, aby teplota nepřesáhla 4°C. Zabraňte opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorků.

Vyvíjení angiotensinu I

Angiotensin I se vyvíjí při pH 6,0 a optimálních podmínkách, aby bylo následně dosaženo vyšší citlivosti u vzorků s nízkou aktivitou reninu a možnosti použití kratší doby vyvíjení. Zvolené podmínky vyvíjení umožňují pracovat s nejnižším možným ředěním vzorku, a tak snižovat vliv ředění na kinetiku vyvíjení angiotensinu I.

- Do vyvíjecích zkumavek **bez nanesené vrstvy**, uložených v ledové lázni, přidejte následující reagens; **přesně dodržujte uvedené pořadí**:
 - . 500 µL vzorku
 - . 10 µL PMSF
 - . 50 µL vyvíjecího pufru.
- Obsah zkumavek promíchejte na třepačce vortex a 200 µL každého vzorku přeneste do druhé série zkumavek bez nanesené vrstvy
- Druhou sérii zkumavek inkubujte po dobu 90 minut při 37°C v termostatické vodní lázni, přičemž první sérii zkumavek (blank vzorky) uchovávejte v ledové lázni.

Doporučená doba vyvíjení je průměrná doba umožňující stanovení PRA u mnoha patofyziologických stavů. Pokud se přepokládají vyšší nebo nižší hodnoty PRA, je třeba tuto dobu zkrátit nebo prodloužit (Obr. 1).
- Po inkubaci při 37°C se vyvíjecí zkumavky musí okamžitě uložit do ledové lázně.

6. POSTUP STANOVENÍ

Stanovení provedte při pokojové teplotě (20-25°C) nejméně s jednou duplicitou. Kalibrátory je nutno testovat přímo v proceduře RIA se zkumavkami s nanesenou vrstvou, bez předchozího vyvíjení angiotensinu I, a musí se provést s každou sérií patientských vzorků. Kalibrátory a vzorky se musí zpracovat stejným postupem a se stejnou dobou vyvíjení.

Provedte všechny kroky analýzy v uvedeném pořadí bez podstatných prodlev mezi jednotlivými kroky.

K dávkování každého kalibrátoru a vzorku se musí použít čistá pipetová špička na jedno použití.

- Reagens dávkujte *na dno zkumavek s nanesenou vrstvou*. Pracujte podle následujícího schématu:

Reagens	Zkumavky	Kalibrátory 0-5	Vzorky a blank vzorky
Kalibrátory		50 µl	–
Vzorky		–	50 µL
Izotopový indikátor		500 µl	500 µl

- Obsah zkumavek **promíchejte** na třepačce vortex a **inkubujte** po dobu **3 až 24 hodin při pokojové teplotě**.
- Pečlivě **aspirujte** inkubační roztok. *Špička aspirátoru se musí dotýkat dna zkumavky s nanesenou vrstvou, aby se odsála veškerá kapalina. Pokud neodsajete ulpělý roztok, může se snížit reprodukovatelnost a výsledky mohou být zkrácené. Nesmí být viditelná žádná stopa barviva.*
- **Změřte radioaktivitu** zkumavek.

7. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Vypočítejte střední čistý počet pro každou skupinu zkumavek. Vypočítejte poměr B/Bo pro každý kalibrátor a pro každý neznámý vzorek podle následujícího vzorce:

$$B/Bo\% = \frac{\text{střední počet pro kalibrátor nebo vzorek}}{\text{střední počty pro nulový kalibrátor}} \times 100$$

Střední procentuální hodnotu pro každý kalibrátor zakreslete do semilogaritmické souřadnicové sítě na osu y jako funkci koncentrace angiotensinu I vyjádřené v ng/ml na ose x. Tím získáte kalibrační křivku (Obr. 2).

Aktivita reninu v plazmě (PRA) se vypočítá jako počet ng vyvinutého angiotensinu I za hodinu v 1 ml, a to pomocí níže uvedeného postupu:

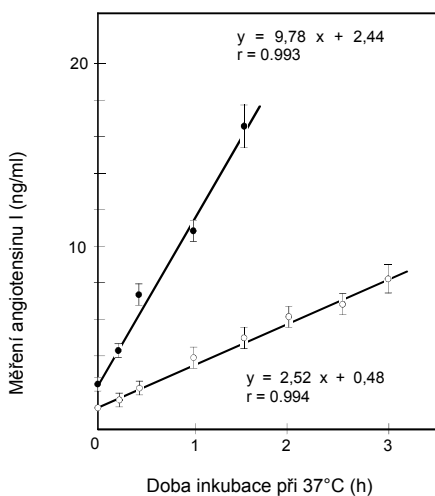
- přímo z kalibrační křivky odečtete koncentraci vyvinutého angiotensinu I v každém vzorku inkubovaném při 37°C a v příslušném blank vzorku (v ledové lázni);
- od každé hodnoty vzorku odečtete příslušnou hodnotu blanku;
- získanou hodnotu vynásobte 1,12, protože vzorky jsou zpočátku ředěny 1:1,12;
- získanou koncentraci podělte dobou vyvíjení (v hodinách):

$$PRA = \frac{(\text{ng } 37^{\circ}\text{C} - \text{ng } 4^{\circ}\text{C}) \times 1,12}{\text{počet hodin inkubace}} = \text{ng/ml/h} \quad (1)$$

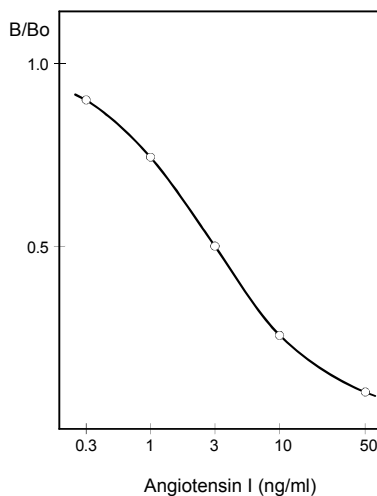
Pokud vyvíjení trvalo 1,5 hodiny, rovnici (1) lze zjednodušit takto:

$$PRA = (\text{ng } 37^{\circ}\text{C} - \text{ng } 4^{\circ}\text{C}) \times 0,747 = \text{ng/ml/h}$$

*g = (1118 x 10⁻⁸)(poloměr v cm)(ot/min)²



Obr. 1 – Kontrola linearity vyvíjení angiotensinu I s prodlužující se dobou inkubace při 37°C a pH 6,0.



Obr. 2

Příklad výpočtu

Následující data je nutno považovat pouze za příklad a nesmí se použít náhradou za data získaná uživatelem.

Popis	cpm	B/Bo x 100
Kalibrátor nuly	19230	100
0,3 ng/ml	17692	92,0
1 ng/ml	14519	75,5
3 ng/ml	9807	51,0
10 ng/ml	5000	26,0
50 ng/ml	2115	11,0
Blank vzorek	17499	91,0
Vzorek	9038	47,0

Interpolací z kalibrační křivky a pomocí rovnice (1) bylo zjištěno, že aktivita reninu v plazmě daného vzorku je 2,39 ng/ml/h.

$$PRA = \frac{(3,5 - 0,3) \times 1,12}{1,5} = 2,39 \text{ ng/ml/h.}$$

8. PŘEDPOKLÁDANÉ HODNOTY

Níže uvedené rozsahy jsou indikativní pouze pro příjem sodíku 100-150 mEq/24 h; každá laboratoř si musí stanovit vlastní referenční rozsahy.

Vyvíjení při pH 6,0 PRA, ng/ml/h	Vleže na zádech	Vestoje
	0,2 - 2,8	1,5 - 5,7

9. SPECIFICKÉ CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

9.1. Analytická specifita

Analytickou specifitu lze definovat jako schopnost testu přesně detekovat konkrétní analyzovanou látku v přítomnosti potenciálně interferujících faktorů ve stejné matici (např. hemolýzy, vlivů přípravy vzorku) nebo zkříženě reagujících analytů.

Jelikož v tomto konkrétním případě se množství analyzované látky vyvíjí in vitro a odečte se blank vzorek, skutečná specifita na protilátky proti angiotensinu I není kritická.

Nicméně spíše než zkřížené reakce s cirkulujícími peptidy souvisejícími s angiotensinem může určité omezení citlivosti testu způsobovat interference s proteiny ve vzorku (blank vzorek). Celkový blank vzorek zahrnuje příspěvky proteinů podobných angiotensinu, cirkulujícího angiotensinu I a angiotensinu I produkovaného působením reninu při nízké teplotě od doby odběru krve do provedení testu.

Interference. Kontrolované studie potenciálně interferujících látek nebo podmínek ukázaly, že provedení testu neovlivňuje vliv lipémie (až do 500 mg/dl triglyceridů) a bilirubinémie (až do 20 mg/dl bilirubinu). Hodnoty angiotensinu I stanovené ve vzorcích obsahujících 1000 mg/dl hemoglobinu jsou o cca 10 % nižší než hodnoty stanovené u normálních vzorků.

Zkřížené reakce Procento zkřížených reakcí u některých peptidů souvisejících s angiotensinem, vypočítané podle Abrahama, ukazuje specifitu použité protilátky.

- Angiotensin I	100 %
- Angiotensin II	< 0,1 %
- Heptapeptid, hexapeptid	<< 0,02 %

9.2 Analytická citlivost

Analytická citlivost může být také vyjádřena jako detekční limit, což je minimální množství specifického analytu detekovatelného testem. Detekční limit je 0,20 ng/ml při 95% spolehlivosti. Tato hodnota byla vypočítána jako zjevná koncentrace analytu rozlišitelná od nulového kalibrátoru, tj. dvojnásobek standardní odchylky od nuly.

9.3 Přesnost

Byly analyzovány různé skupiny vzorků s různými hodnotami PRA s cílem stanovit opakovatelnost a reprodukovatelnost testu (tj. variabilitu v rámci testu a mezi testy).

Opakovatelnost	A	B	C
Počet stanovení	10	10	10
Střední hodnota (ng/h)	2,3	8,8	13,5
Standardní odchylka	0,17	0,48	1,34
Variační koeficient (%)	7,5	5,4	9,9

Reprodukovatelnost	A	B	C
Počet stanovení	10	10	10
Střední hodnota (ng/ml/h)	2,6	8,6	13,0
Standardní odchylka	0,20	0,70	1,50
Variační koeficient (%)	7,7	8,1	11,5

9.4. Spolehlivost

Spolehlivost stanovení byla ověřena pomocí dilučního testu a testu výtěžnosti.

Diluční test. Byly testovány dva vzorky s vysokou koncentrací angiotensinu I po sériovém ředění nulovým kalibrátorem.

Ředění	Předpokládaná koncentrace (ng/ml)	Naměřená koncentrace (ng/ml)	% výtěžnost (recovery)
Neředěné	–	17,5	–
1:2	8,75	8,6	98,3
1:4	4,38	4,5	102,9
1:8	2,19	2,3	105,1
1:16	1,09	1,1	100,6
Neředěné	–	8,5	–
1:2	4,25	4,4	103,5
1:4	2,13	2,2	103,5
1:8	1,06	1,1	103,5
1:16	0,53	0,5	94,1

Test výtěžnosti. Byly testovány dva vzorky s nízkou koncentrací angiotensinu I přímo a po smíchání se zvyšujícím se množstvím angiotensinu I.

Přidaná koncentrace (ng/ml)	Předpokládaná koncentrace (ng/ml)	Naměřená koncentrace (ng/ml)	% výtěžnost (recovery)
–	–	11,2	–
1,5	7,1	7,0	98,6
5,0	10,6	10,7	100,9
25,0	30,6	30,0	98,0
–	–	15,6	–
1,5	9,3	9,1	97,8
5,0	12,8	12,2	95,3
25,0	32,8	30,7	93,6

10. OMEZENÍ POSTUPU

Klinická významnost testu PRA je nespolehlivá, je-li test proveden na pacientech, kteří nejsou v kontrolovaných podmínkách, co se týče příjmu sodíku a draslíku, a kteří nezaujímají stanovenou polohu, nebo jimž byly podány léky, jako například diuretika, chlonidin, betablokátory, estroprogestogeny nebo periferní vazodilatátory, které ovlivňují vylučování reninu.

Diagnostika musí být založena na základě výsledku jednoho testu, ale musí být stanovena v součinnosti s klinickým nálezem a dalšími klinickými postupy a také podle lékařského úsudku.

Na výsledky testu může mít vliv bakteriální kontaminace nebo opakované zmrazení a rozmrazení vzorků.

Pro získání spolehlivých výsledků je nutné zvládnutí techniky a přísné dodržování návodu. Obzvláště důležité je zejména přesné pipetování a správná aspirace.

Sníženou reprodukovatelnost výsledků mohou způsobit metodologické faktory, zejména:

- záměna víček zkumavek;
- použití stejné špičky při odběrech z různých zkumavek nebo pro dávkování různých vzorků;
- ponechání zkumavek dlouhodobě otevřených;
- vystavení reagentů nebo vzorků působení intenzivního tepla nebo zdrojům silné bakteriální kontaminace;
- neadekvátní aspirace inkubačního roztoku;
- kontaminace okrajů zkumavek izotopovým indikátorem nebo vzorky;
- příležitostná oscilace detektoru gama záření nebo nesprávná manipulace s ním;
- použití reagentů z různých šarží.

11. VAROVÁNÍ A ZVLÁŠTNÍ OPATŘENÍ

Komponenty testu obsahují jako konzervační látku azid sodný. Vzhledem k tomu, že azid sodný může v potrubí vytvářet výbušný azid olovnatý nebo azid měďnatý, doporučuje se dokonale propláchnout odpadní potrubí po likvidaci roztoků obsahujících azid sodný velkým množstvím vody (Směrnice Rady 99/45/EC).

R 22 – Škodlivé při polknutí.

R 31 – Uvolňuje toxický plyn při styku s kyselinami.

S 28 – Při styku s kůží okamžitě omyjte velkým množstvím vody.

S 45 – V případě nehody, nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno, ukažte toto označení).

PMSF (Směrnice Rady 99/45/EC):

R 22 – Škodlivé při polknutí.

R 36/38 – Dráždí oči a kůži.

S 45 – V případě nehody, nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno, ukažte toto označení).

Ethanol (Směrnice Rady 99/45/EC):

R 11 – Vysoce hořlavý.

S 7 – Nádobu uchovávejte dobře uzavřenou.

S 16 – Nevystavujte otevřenému ohni. Nekuřte.

Všechny jednotky séra a plazmy, použité k výrobě komponent dodaných v této soupravě, byly testovány na HBsAg, anti-HCV a anti-HIV-1/2 a shledány nereaktivními. Jelikož však žádná testovací metoda nemůže poskytnout absolutní jistotu nepřítomnosti patogenů, všechny vzorky lidského původu se musí považovat za potenciálně infekční a musí se s nimi nakládat opatrně.

12. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- V laboratoři, kde probíhá stanovení, nejzte, nepijte, nekuřte ani nenanášejte kosmetické prostředky.
- Nepipetujte roztoky ústy.
- Zabraňte kontaktu se všemi potenciálně infekčními materiály pomocí ochranného oblečení, jako jsou laboratorní pláště, ochranné brýle a rukavice na jedno použití. Po provedení každého stanovení si důkladně umyjte ruce.
- Zabraňte rozstříknutí nebo vytvoření aerosolu. Dojde-li k rozlití reagens, je nutné reagens vždy opláchnout 5 % roztokem chlornanu sodného a zlikvidovat je, jako by bylo potenciálně infekční.
- Všechny vzorky, biologická reagentia a materiály použité během stanovení musejí být považovány za materiál, který může potenciálně přenášet infekční agens. Proto je nutné likvidovat je v souladu s platnými předpisy a pokyny úřadů, do jejichž působnosti laboratoř spadá, a právními předpisy příslušné země. Materiál na jedno použití musí být spálen; tekutý odpad musí být dekontaminován pomocí chlornanu sodného v konečné koncentraci 5 %, a to nejméně po dobu půl hodiny. Jakýkoli materiál určený pro opakované použití musí být sterilizován v autoklávu *při vyšších parametrech, než jsou nutné pro plnou sterilizaci* (USP 24, 2000, str. 2143). Za postačující se obvykle považuje sterilizace po dobu 1 hodiny při 121°C, i když uživatelé musejí obvykle kontrolovat účinnost cyklu dekontaminace tak, že provedou počáteční validaci a pravidelně budou používat biologické ukazatele.

13. ZÁKLADNÍ PRAVIDLA RADIAČNÍ BEZPEČNOSTI

Reagens obsahující jód-125

Tato souprava obsahuje radioaktivní materiál v dávce nepřevyšující 2,1 μCi (76 kBq) jódu-125. Při uskladnění tohoto materiálu, manipulaci s ním a jeho likvidaci se musí používat příslušná opatření a zásady správné laboratorní praxe.

Pro lékaře a instituce přijímající radioizotopy v rámci obecné licence:

Tento radioaktivní materiál mohou přijímat, vlastnit a používat pouze lékaři, veterinární lékaři v rámci veterinární praxe, klinické laboratoře nebo nemocnice, a to výhradně pro účely klinických nebo laboratorních testů *in vitro*, které nezahnují vnitřní ani vnější podání tohoto materiálu ani radiace z něj vycházející lidským pacientům ani zvířatům. Přijetí, pořízení, vlastnění, použití a transport tohoto materiálu podléhá předpisům a všeobecné licenci komise pro jadernou kontrolu (Nuclear Regulatory Commission) USA nebo státu, se kterým tato komise uzavřela dohodu o uplatňování regulačních předpisů.

1. Skladování radioaktivního materiálu se musí omezovat pouze na určený prostor.
2. Přístup k radioaktivnímu materiálu může mít pouze oprávněný personál.
3. Radioaktivní materiál nepipetujte ústy.
4. Při práci v prostorech určených k práci s radioaktivním materiálem nejzte, nepijte ani nekuřte.
5. V případě rozlití je nutno materiál setřít, potom omýt alkalickým detergentem nebo roztokem k radiologické dekontaminaci. Veškeré použité sklo se musí úplně umýt vodou před mytím s jiným laboratorním sklem.

Pro lékaře a instituce přijímající radioizotopy v rámci specifické licence:

přijetí, použití, transport a likvidace radioaktivních materiálů podléhá předpisům a podmínkám specifické licence.

POZOR: Hodnoty radioaktivity uvedené na příbalové informaci v balení se mohou mírně lišit od hodnot uvedených na označení krabice a na označení lahvičky s izotopovým indikátorem. Označení krabice a lahvičky s izotopovým indikátorem označuje množství radioaktivity k datu kalibrace; příbalová informace v balení označuje teoretickou radioaktivitu soupravy.

SCHÉMA ANALÝZY

- 1 - REKONSTITUJTE REAGENS.
- 2 - VYVÍJEJTE ANGIOTENSIN I PO DOBU 90 MINUT PŘI 37°C VE ZKUMAVKÁCH BEZ NANESENÉ VRSTVY.
- 3 - OZNAČTE DUPLICITNĚ ZKUMAVKY S NANESENOU VRSTVOU PRO TEST RIA.
- 4 - NADÁVKUJTE REAGENS V NÁSLEDUJÍCÍM POŘADÍ A PROMÍCHEJTE INKUBAČNÍ ROZTOK:

	ZKUMAVKY	CAL 0-5	VZORKY A BLANKY
REAGENS			
KALIBRÁTORY		50 μl	–
VZORKY		–	50 μl
IZOTOPOVÝ INDIKÁTOR		500 μl	500 μl

- 5 - INKUBUJTE PO DOBU OD 3 DO 24 HODIN PŘI POKOJOVÉ TEPLOTĚ.
- 6 - PEČLIVĚ ASPIRUJTE INKUBAČNÍ ROZTOK.
- 7 - ZMĚŘTE RADIOAKTIVITU ZKUMAVEK.

**ΚΙΤ ΓΙΑ ΤΗ ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗ
ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΤΟΝΙΝΗΣ I**

**Διαδικασία για τη μέτρηση της πλασματικής νεφρικής δραστηριότητας (PRA)
μέσω ποσοτικής δοσομέτρησης της αγγειοτονίνης I
σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος**

Μόνο για χρήση in vitro

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η νεφρίνη είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο με μοριακό βάρος 40.000 dalton περίπου, και αποτελεί προϊόν του παρασπειραματικού συστήματος του νεφρού. Αυτό το ένζυμο διασπά το υπόστρωμά του, το αγγειοτενσιονόγονο, δημιουργώντας ένα δεκαπεπτίδιο, την αγγειοτονίνη I, μοριακού βάρους 1.300 dalton περίπου. Αυτό το πολυπεπτίδιο κατόπιν, υδrolύεται από το ένζυμο μετατροπής (ACE) στο οκταπεπτίδιο αγγειοτονίνη II, το οποίο είναι βιολογικά ενεργό.

Το ορμονικό προϊόν του συστήματος νεφρίνη-αγγειοτονίνη, η αγγειοτονίνη II, έχει μια εξαιρετικά βραχεία βιολογική ημιζωή, αλλά είναι το πιο ισχυρό αγγειοσυσταλτικό που είναι γνωστό. Τα κύρια αποτελέσματά του είναι η αγγειοσυστολή, η διέγερση του συμπαθητικού νευρικού συστήματος και η διέγερση της έκκρισης αλδοστερόνης εκ μέρους του επινεφριδίου.

Από τη στιγμή που τα επίπεδα αγγειοτονίνης I αντιπροσωπεύουν άμεσα την πλασματική νεφρική δραστηριότητα, η μέτρηση αυτής της τελευταίας έχει ευρέως υιοθετηθεί για την αξιολόγηση του συστήματος νεφρίνης-αγγειοτονίνης σε παθολογικές συνθήκες. Η μέτρηση της πλασματικής νεφρικής δραστηριότητας (PRA) στους υπερτασικούς αποτελεί σημαντική βοήθεια στη διαφορική διάγνωση του πρωτογενούς και δευτερογενούς αλδοστερονισμού.

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την έκκριση της νεφρίνης, η οποία απενεργοποιείται από τα πλασματικά επίπεδα της αγγειοτονίνης II και ADH, από μια υψηλότερη κατακράτηση νατρίου και καλίου και από μια μεγαλύτερη πίεση νεφρικής παρέγχυσης. Εξ άλλου, μια έλλειψη νατρίου και καλίου, μια μειωμένη πίεση νεφρικής παρέγχυσης και η δραστηριότητα του συμπαθητικού νευρικού συστήματος προκαλούν μια μεγαλύτερη έκκριση νεφρίνης.

2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗΣ

Η μέτρηση της νεφρικής δραστηριότητας βασίζεται στη ραδιοανοσολογική δοσομέτρηση της αγγειοτονίνης I. Δύο είναι οι σημαντικότερες φάσεις της διαδικασίας:

- δημιουργία αγγειοτονίνης I σε δείγματα πλάσματος μέσω επώασης στους 37°C σε συνθήκες σε θέση να προλάβουν την ενζυματική υποβάθμιση της αγγειοτονίνης I (παρουσία του ενζυματικού αναστολέα PMSF) και που θεωρούνται οι πιο ενδεδειγμένες για τη νεφρική δραστηριότητα
- ραδιοανοσολογική δοσομέτρηση αγγειοτονίνης I σε δοκιμαστικούς σωλήνες ευαισθητοποιημένους σε δύο κλάσματα του ίδιου δείγματος, ένα επωασμένο στους 37°C για τη δημιουργία και ένα μη επωασμένο (λευκό του δείγματος).

Η αρχή της ραδιοανοσολογικής δοσομέτρησης συνίσταται στον ανταγωνισμό ανάμεσα στην ιχνηθετημένη αγγειοτονίνη I και στην αγγειοτονίνη που περιέχεται στους βαθμονομητές ή στα δείγματα για το σταθερό και περιορισμένο αριθμό θέσεων των αντισωμάτων. Έπειτα από την επώαση RIA, η ποσότητα της ιχνηθετημένης αγγειοτονίνης I που έχει δημιουργήσει δεσμό με το συνδεδεμένο αντίσωμα στους ευαισθητοποιημένους δοκιμαστικούς σωλήνες είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της μη ιχνηθετημένης αγγειοτονίνης I που υπάρχει στους βαθμονομητές ή στα δείγματα. Η μέθοδος που υιοθετείται για το διαχωρισμό ελεύθερης/συνδεδεμένης βασίζεται στη χρήση των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωληνίων, όπου το αντίσωμα έχει συνδεθεί στα τοιχώματα των δοκιμαστικών σωληνίων.

3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΚΙΤ

Ευαισθητοποιημένοι δοκιμαστικοί σωλήνες	100
Ιχνηθετημένη αγγειοτονίνη I με ¹²⁵ I	2 φιαλίδια
Βαθμονομητές αγγειοτονίνης I	6 φιαλίδια
Πλάσμα ελέγχου	1 φιαλίδιο
Ρυθμιστικό δημιουργίας	1 φιαλίδιο
Ενζυματικός αναστολέας (PMSF)	1 φιαλίδιο
Αριθμός δοσομετρήσεων	100

ΤΡΟΠΟΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ: Κατά τη στιγμή της άφιξης, διατηρήστε τα κιτ στους 2-8°C Μην καταψύχετε. Έπειτα από το άνοιγμα, τα αντιδραστήρια αυτού του κιτ είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξεως εάν διατηρηθούν καταλλήλως. Το κιτ είναι εγγυημένο για 3 αναλυτικές σειρές εάν τα αντιδραστήρια διατηρούνται σύμφωνα με όσα συνιστώνται από τον κατασκευαστή.

Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια πέραν της ημερομηνίας λήξεως. Η ημερομηνία λήξεως του κιτ φαίνεται στην εξωτερική ετικέτα και ανταποκρίνεται στην ημερομηνία λήξεως του ιχνηθέτη. Η ημερομηνία λήξεως καθενός συστατικού φέρεται στις ετικέτες των αντίστοιχων φιαλιδίων.

Κατά την ανασύσταση των φιαλιδίων, ανακινήστε απαλά ώστε να αποφύγετε τη δημιουργία αφρού. Μην αναμιγνύετε αντιδραστήρια που προέρχονται από διαφορετικές παρτίδες.

3.1. Ευαισθητοποιημένοι δοκιμαστικοί σωλήνες

Η εσωτερική επιφάνεια κάθε δοκιμαστικού σωλήνα έχει επενδυθεί με IgG κουνελίου αντι-αγγειοτονίνη I βιοθυνιλιωμένες.

Τη στιγμή της χρήσης, φέρατε τους ευαισθητοποιημένους δοκιμαστικούς σωλήνες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν να ανοίξετε το δοχείο, ώστε να αποφύγετε συμπύκνωση της υγρασίας. Οι αχρησιμοποίητοι δοκιμαστικοί σωλήνες πρέπει να διατηρούνται στο καλά κλειστό δοχείο. Μην αναμιγνύετε διαφορετικές παρτίδες ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων.

3.2. Ιχνηθετημένη Ιλεου-5-αγγειοτονίνη I με ¹²⁵I (κόκκινη): λυόφιλο αντιδραστήριο

Κάθε φιαλίδιο περιέχει ορμόνη ιχνηθετημένη με ¹²⁵I, βόεια αλβουμίνη ορού, φωσφορικό ρυθμιστικό, συντηρητικά και μια αδρανή κόκκινη χρωστική. Η μέγιστη ραδιενέργεια είναι 81 kBq (2.2 μCi) ανά φιαλίδιο κατά την ημερομηνία της βαθμονόμησης.

Πραγματοποιήστε ανασύσταση του περιεχομένου κάθε φιαλιδίου με 26 mL απεσταγμένου νερού. Διατηρήστε το διάλυμα που προκύπτει σε κατεψυγμένα κλάσματα στους -20°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.

3.3. Βαθμονομητές Ιλεου-5-αγγειοτονίνης I: λυόφιλο αντιδραστήριο

Κάθε φιαλίδιο περιέχει αυξανόμενες ποσότητες αγγειοτονίνης I, βόεια αλβουμίνη ορού, φωσφορικό ρυθμιστικό και συντηρητικά.

Πραγματοποιήστε ανασύσταση του περιεχομένου κάθε φιαλιδίου με 1 mL απεσταγμένου νερού. Τα διαλύματα που προκύπτουν περιέχουν αντίστοιχα 0 - 0,3 - 1 - 3 - 10 - 50 ng/mL και πρέπει να διατηρούνται σε κατεψυγμένα κλάσματα στους -20°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Οι βαθμονομητές του kit εναλλάσσονται με τα δείγματα υπό εξέταση όταν χρησιμοποιούνται με τα αντιδραστήρια και την επιχειρησιακή διαδικασία του αντίστοιχου διαγνωστικού τεστ in vitro, σύμφωνα με όσα συνιστώνται από τον κατασκευαστή.

3.4. Πλάσμα ελέγχου: λυόφιλο αντιδραστήριο

Το φιαλίδιο περιέχει ανθρώπινο πλάσμα και συντηρητικά. Το εύρος των συγκεντρώσεων κάθε ελέγχου αναφέρεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης και δείχνει τα όρια που έχουν καθοριστεί από την DiaSorin για τιμές ελέγχων που μπορούν να επιτευχθούν σε αξιόπιστους κύκλους εξετάσεων.

Πραγματοποιήστε ανασύσταση του περιεχομένου του φιαλιδίου με 2 mL κρύο απεσταγμένο νερό, αποφεύγοντας η θερμοκρασία να υπερβαίνει τους 4°C. Διατηρήστε το διάλυμα που προκύπτει σε κατεψυγμένα κλάσματα στους -20°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Το πλάσμα ελέγχου πρέπει να μεταχειρίζεται όπως και ένα δείγμα και η αγγειοτονίνη I που δημιουργείται για 90 min στους 37°C πριν τη δοσομέτρηση.

3.5. Ρυθμιστικό δημιουργίας (μπλε): αντιδραστήριο έτοιμο προς χρήση

Το φιαλίδιο περιέχει 4 mL διαλύματος κιτρικού ρυθμιστικού, σταθεροποιητικά, συντηρητικά και μια αδρανή μπλε χρωστική.

3.6. Ενζυματικός αναστολέας (PMSF) : αντιδραστήριο έτοιμο προς χρήση

Το φιαλίδιο περιέχει 1,0 mL φενυλμεθυλοσουλφονυλ-φθοριούχου (PMSF) στο 5% (R 23/ 24/25, S 36, S 45) σε διάλυμα αιθανόλης (R 11, S 7, S 16).

Εάν το προϊόν στους 2-8°C τείνει να κρυσταλλοποιηθεί, ζεστάνετε το στους 37°C.

4. ΒΟΗΘΗΤΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Απεσταγμένο και αποϊονισμένο νερό.
- Γυάλινα είδη εργαστηρίου.
- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες μίας χρήσεως.
- Έδρανα δοκιμαστικών σωλήνων.
- Μικρομετρικές σύριγγες με άκρα μίας χρήσεως των 10, 50 μL (ακρίβεια ± 3%, επαναληπτικότητα 2%) και 200, 500 μL (ακρίβεια ± 2%, επαναληπτικότητα 1%).
- Αναδευτήρας Vortex.
- Υδατόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας σε θέση να διατηρεί 37° ± 1°C.
- Σύστημα για την αναρρόφηση του μίγματος επώασης.
- Μετρητής γάμμα για τη μέτρηση του Ιωδίου ¹²⁵I (ρύθμιση παραμέτρων του παραθύρου του μετρητή: 15-80 keV - απόδοση του μετρητή: 70% - χρόνος μέτρησης: 1 min). Εάν η απόδοση του μετρητή είναι κατώτερη του 60%, πρέπει να παραταθεί ο χρόνος μέτρησης σε 2 min.

5. ΕΞΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ανάληψη των δειγμάτων

Συνίσταται να τυποποιήσετε επιμελώς την προπαρασκευή του ασθενούς και τις συνθήκες ανάληψης του δείγματος. Σας συνιστούμε να συλλέγετε το αίμα σε προψυγμένους δοκιμαστικούς σωλήνες με νατριούχο EDTA σαν αντιπηκτικό.

Τα δείγματα αίματος δεν πρέπει να αναλήπτονται χρησιμοποιώντας ηπαρίνη σαν αντιπηκτικό, από τη στιγμή που αυτή παρεμβάλεται στη δημιουργία αγγειοτονίνης I. Αντιθέτως, το EDTA παρουσιάζει το πλεονέκτημα να είναι ένα αποτελεσματικό αντιπηκτικό και να συμβάλλει ταυτόχρονα στην αναστολή του ενζύμου μετατροπής.

Τα δείγματα πρέπει να διατηρούνται στους 2-8°C και κατόπιν να τίθενται υπό φυγοκέντριση εν ψυχρό σε περίπου 2000 g ώστε να διαχωρίζεται το πλάσμα. Καθαρίστε με φιλτράρισμα ή φυγοκέντριση πριν από το τεστ τα δείγματα που παρουσιάζουν υλικό σε αιώρηση, λευκαύγεια, λιπαυμία ή ερυθροκυτταρικά υπόλοιπα. Μην χρησιμοποιείτε δείγματα που έχουν υποστεί ισχυρή αιμόλυση ή λιπαιμικά, ούτε επίσης και δείγματα που παρουσιάζουν υλικό σε αιώρηση ή προφανή μόλυνση από μικρόβια. Εάν η δοσομέτρηση δεν πραγματοποιηθεί αμέσως, τα δείγματα θα πρέπει να διαιρεθούν σε κατεψυγμένα κλάσματα στους -20°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες μέχρι τη στιγμή της δοσομέτρησης. Εάν τα δείγματα έχουν αποψυχθεί, αναδεύστε με προσοχή πριν να τα δοσομετρήσετε, αποφεύγοντας η θερμοκρασία να υπερβαίνει τους 4°C. Αποφύγετε επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης και απόψυξης.

Δημιουργία αγγειοτονίνης I

Η δημιουργία αγγειοτονίνης I σε pH 6,0 πραγματοποιείται υπό ιδανικές συνθήκες για τη δράση της νεφρίνης με επακόλουθη καλύτερη ευαισθησία για τα δείγματα χαμηλής νεφρικής δραστηριότητας και δυνατή χρησιμοποίηση βραχύτερων χρόνων δημιουργίας. Οι προεπιλεγμένες συνθήκες δημιουργίας επιτρέπουν να λειτουργείτε με τη μικρότερη δυνατή αραίωση του δείγματος, μειώνοντας το αποτέλεσμα της αραίωσης στην κινητική της δημιουργίας της αγγειοτονίνης I.

- Προσθέστε τα αντιδραστήρια σε δοκιμαστικούς σωλήνες δημιουργίας **μη ευαισθητοποιημένους** διατηρημένους σε πάγο, **ακολουθώντας πιστά αυτή τη σειρά:**
 - . 500 μL δείγματος
 - . 10 μL PMSF
 - . 50 μL ρυθμιστικού δημιουργίας.
- Αναδεύστε το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωληνίων σε Vortex και μεταφέρετε 200 μL κάθε δείγματος σε μια δεύτερη σειρά μη ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωληνίων.
- Επώαστε τη δεύτερη σειρά δοκιμαστικών σωληνίων σε θερμοστατικό μπάνιο στους 37°C για 90 min και διατηρείστε την πρώτη σειρά των δοκιμαστικών σωληνίων σε μπάνιο πάγου (λευκά των δειγμάτων). *Ο συνιστώμενος χρόνος δημιουργίας είναι ένας μέσος χρόνος που επιτρέπει μια δημιουργία αγγειοτονίνης, επαρκούς για την αξιολόγηση του μεγαλύτερου μέρους των φυσιολογικών συνθηκών. Όταν προβλέπονται υψηλότερες ή χαμηλότερες τιμές, ο χρόνος δημιουργίας μπορεί να είναι αντίστοιχα μικρότερος ή μεγαλύτερος, από τη στιγμή που η ποσότητα αγγειοτονίνης που δημιουργείται είναι μια γραμμική συνάρτηση του χρόνου (Εικόνα 1).*
- Έπειτα από την επώαση στους 37°C οι δοκιμαστικοί σωλήνες δημιουργίας πρέπει να μεταφερθούν αμέσως σε μπάνιο πάγου.

6. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Η διανομή των αντιδραστηρίων πρέπει να γίνει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20-25°C) προβλέποντας προσδιορισμούς τουλάχιστον εις διπλούν. Οι βαθμονομητές πρέπει να χρησιμοποιηθούν απευθείας στη δοσομέτρηση RIA με ευαισθητοποιημένους δοκιμαστικούς σωλήνες χωρίς να υποβληθούν προηγουμένως στη δημιουργία αγγειοτονίνης I. Εκτελέστε τον προσδιορισμό των βαθμονομητών για κάθε σειρά δειγμάτων που αναλύεται. Η επιχειρησιακή μέθοδος πρέπει να είναι αυστηρά όμοια για τους βαθμονομητές και για τα δείγματα υπό εξέταση.

Εκτελέστε τις φάσεις της δοσομέτρησης με την προβλεπόμενη σειρά, χωρίς διακοπές.

Χρησιμοποιήστε μια νέα άκρη μίας χρήσεως για να απαλάξετε τους βαθμονομητές και τα δείγματα.

- Διανήμετε τα αντιδραστήρια στον πυθμένα των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωληνίων. *Ενεργήστε σύμφωνα με το ακόλουθο σχεδιάγραμμα:*

δοκιμαστικοί σωλήνες	Βαθμονομητές	Δείγματα και λευκά
αντιδραστήρια	0-5	
Βαθμονομητές	50 μL	–
Δείγματα	–	50 μL
Ιχνηθέτης	500 μL	500 μL

Ανακινήστε το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωληνίων σε αναδευτήρα Vortex και **αφήστε για επώαση για 3-24 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.**

- **Αναρροφήστε** επιμελώς το μίγμα επώασης. *Βεβαιωθείτε ότι η αποβολή του υγρού είναι πλήρης, όντας σίγουροι ότι η άκρη της μικροσύριγγας αναρρόφησης ακουμπά στον πυθμένα των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωληνίων. Η παρουσία σταγόνων που εφάπτονται στα τοιχώματα των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωληνίων μπορεί να προκαλέσει μειωμένη αναπαραγωγικότητα ή μη έμπιστα αποτελέσματα. Δεν πρέπει να μείνει ίχνος της χρωστικής.*
- **Μετρήστε τη ραδιενέργεια** των δοκιμαστικών σωληνίων.

7. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπολογίστε το μέσο όρο των μετρήσεων για κάθε ομάδα δοκιμαστικών σωληνίων, αφού έχετε αφαιρέσει την τιμή του ιζήματος. Εκφράστε το μέσο όρο των μετρήσεων βαθμονομητών και δειγμάτων ως εκατοστιαίο σε σχέση με το βαθμονομητή μηδέν:

$$B/Bo\% = \frac{\text{μέση μέτρηση βαθμονομητών και δειγμάτων}}{\text{μέση μέτρηση βαθμονομητή μηδέν}} \times 100$$

Φέρατε σε γραφικό διάγραμμα semilog τον εκατοστιαίο μέσο όρο που υπολογίστηκε για κάθε βαθμονομητή στον άξονα των τεταγμένων (άξονας των Y) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση αγγειοτονίνης I εκφρασμένη σε ng/mL στο άξονα των τεταγμένων (άξονας των X). Επιτυγχάνεται έτσι μια καμπύλη βαθμονόμησης (Εικόνα 2).

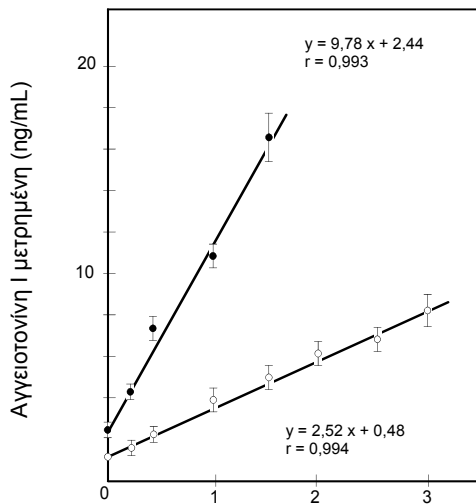
Η πλασματική νεφρική δραστηριότητα (PRA) υπολογίζεται σε ng αγγειοτονίνης I ανά mL ανά ώρα, με την ενδεικνυόμενη διαδικασία:

- διαβάστε απευθείας από την καμπύλη βαθμονόμησης τη συγκέντρωση της αγγειοτονίνης I που δημιουργήθηκε για κάθε επωασμένο δείγμα στους 37°C και για το αντίστοιχο λευκό του δείγματος (διατηρημένο σε μπάνιο πάγου)
- αφαιρέστε από την τιμή κάθε δείγματος την τιμή του αντίστοιχου λευκού
- πολλαπλασιάστε την τιμή που επιτεύχθηκε επί 1,12 από τη στιγμή που το δείγμα ήταν αρχικά αραιωμένο με αναλογία 1:1,12
- διαιρέστε τις συγκεντρώσεις που επιτεύχθηκαν δια το χρόνο δημιουργίας εκφρασμένο σε ώρες:

$$PRA = \frac{(ng\ 37^{\circ}C - ng\ 4^{\circ}C) \times 1,12}{\text{ώρες επώασης}} = ng/mL/ώρα. \quad (1)$$

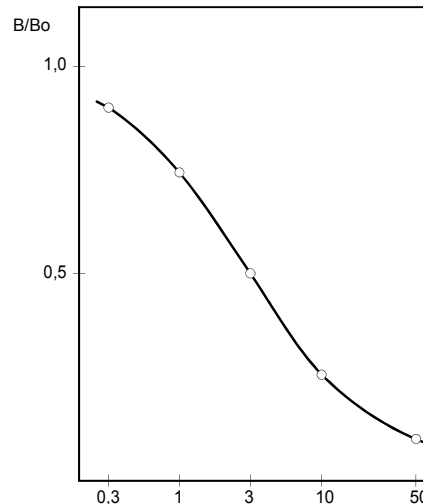
Για ένα χρόνο δημιουργίας 1,5 ώρα ο τύπος (1) μπορεί να απλοποιηθεί ως εξής:

$$PRA = (ng\ 37^{\circ}C - ng\ 4^{\circ}C) \times 0,747 = ng/mL/ώρα.$$



Χρόνος επώασης στους 37°C (ώρες)

Εικόνα 1 - Έλεγχος της γραμμικότητας της δημιουργίας της αγγειοτονίνης I αυξάνοντας το χρόνο επώασης στους 37°C, pH 6,0.



Αγγειοτονίνη I, ng/mL

Εικόνα 2

Παράδειγμα υπολογισμού

Τα ακόλουθα στοιχεία πρέπει να θεωρηθούν μόνο ένα παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν ανάμεσα στα στοιχεία που θα προκύψουν στο χρήστη.

Περιγραφή	cpm	B/Bo x 100
Βαθμονομητής μηδέν	19.230	100
0,3 ng/mL	17.692	92,0
1 ng/mL	14.519	75,5
3 ng/mL	9.807	51,0
10 ng/mL	5.000	26,0
50 ng/mL	2.115	11,0
Λευκό δείγματος	17.499	91,0
Δείγμα	9.038	47,0

Παρεμβάλλοντας από την καμπύλη βαθμονόμησης και εφαρμόζοντας τον τύπο (1), το δείγμα προκύπτει να έχει νεφρική δραστηριότητα (PRA) 2,39 ng/mL/ώρα.

$$PRA = \frac{(3,5 - 0,3) \times 1,12}{1,5} = 2,39 \text{ ng/mL/ώρα.}$$

8. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι τιμές που εμφανίζονται στον ακόλουθο πίνακα είναι αποκλειστικά ενδεικτικές για μια εισφορά νατρίου της τάξεως των 100-150 mEq/24 ώρες. Συνιστούμε σε κάθε εργαστήριο να προσδιορίσει τα δικά του διαστήματα αναφοράς.

Δημιουργία σε pH 6,0	Υπτια θέση	Όρθια θέση
PRA, ng/mL/ώρα	0,2 - 2,8	1,5 - 5,7

9. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΟΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΙΤ

9.1. Ειδικότητα ανάλυσης

Η αναλυτική ειδικότητα ορίζεται σαν η ικανότητα του τεστ να ανιχνεύει ακριβώς τον αναλύτη παρουσία παραγόντων δυνητικά παρεμβαλλόντων στο στέλεχος του δείγματος (για παράδειγμα, αιμόλυση, αποτελέσματα της επεξεργασίας του δείγματος) ή διασταυρούμενες αντιδράσεις με αναλύτες δυνητικώς παρεμβαλλόντες.

Από τη στιγμή που σε αυτήν την ειδική περίπτωση η ποσότητα της δοσομετρούμενης ουσίας έχει δημιουργηθεί in vitro και το λευκό του δείγματος αφαιρείται, η πραγματική ειδικότητα του αντισώματος αντι-αγγειοτονίνης I δεν είναι κρίσιμη.

Παρ'όλα αυτά, δεν είναι οι παρεμβολές με κυκλοφορούντα πεπτιδία παρόμοια με αγγειοτονίνη, αλλά οι παρεμβολές με πρωτεΐνες του δείγματος (λευκό του δείγματος) που περιορίζουν την ευαισθησία της δοσομέτρησης. Το λευκό του δείγματος εμπεριέχει τις εισφορές πρωτεϊνών παρόμοιων με την αγγειοτονίνη και της κυκλοφορούσας αγγειοτονίνης I και παραγμένης από τη δράση της νεφρίνης ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες από τη στιγμή της ανάληψης του αίματος μέχρι τη στιγμή της δοσομέτρησης.

Παρεμβολές. Μελέτες που έχουν ελεγχθεί σχετικά με παράγοντες δυνητικώς παρεμβαλλόντες, έχουν αποδείξει το ότι οι επιδόσεις του τεστ δεν επηρεάζονται από λιπαιμία (μέχρι 500 mg/dL τριγλυκερίδια), χολερυθριναιμία (μέχρι 20 mg/dL χολερυθρίνης). Οι τιμές αγγειοτονίνης I που επιτυγχάνονται με δείγματα που περιέχουν 1000 mg/dL αιμοσφαιρίνης προκύπτουν περίπου 10% κατώτερες από εκείνες που επιτυγχάνονται με φυσιολογικά δείγματα.

Διασταυρούμενες αντιδράσεις. Τα εκατοστιαία ποσοστά διασταυρώμενων αντιδράσεων ορισμένων πεπτιδίων παρόμοιων με την αγγειοτονίνη που έχουν υπολογιστεί σύμφωνα με Abraham, επιδεικνύουν την ειδικότητα του χρησιμοποιούμενου αντισώματος.

- Αγγειοτονίνη I 100%
- Αγγειοτονίνη II < 0,1%
- Επταπεπτιδίο, εξαπεπτιδίο << 0,02%

9.2. Ευαισθησία ανάλυσης

Η αναλυτική ευαισθησία μπορεί να εκφρασθεί επίσης σας όριο ανίχνευσης, ή η ελάχιστη ποσότητα αναλύτη που είναι ανιχνεύσιμη από το τεστ. Το όριο ανίχνευσης είναι 0,20 ng/mL στο 95% εμπιστοσύνης. Έχει υπολογιστεί σαν η φαινομενική συγκέντρωση του αναλύτη που διακρίνεται από τον βαθμονομητή μηδέν, ή δύο τυπικές αποκλίσεις κάτω από το μηδέν.

9.3. Επαναληπτικότητα

Η επαναληπτικότητα και η αναπαραγωγικότητα του δείγματος (ή αλλιώς η δια-δειγματική και ενδο-δειγματική μεταβλητότητα) έχουν καθοριστεί χρησιμοποιώντας δείγματα αναφοράς σε διαφορετικά επίπεδα PRA.

Επαναληπτικότητα	A	B	C
Αριθμός καθορισμών	10	10	10
Μέσος όρος (ng/mL/ώρα)	2,3	8,8	13,5
Τυπική απόκλιση	0,17	0,48	1,34
Βαθμός μεταβολής (%)	7,5	5,4	9,9

Αναπαραγωγικότητα	A	B	C
Αριθμός καθορισμών	10	10	10
Μέσος όρος (ng/mL/ώρα)	2,6	8,6	13,0
Τυπική απόκλιση	0,20	0,70	1,50
Βαθμός μεταβολής (%)	7,7	8,1	11,5

9.4. Ακρίβεια

Η ακρίβεια της δοσομέτρησης έχει ελεγχθεί μέσω τεστ αραιώσης και ανάκτησης.

Τεστ αραιώσης. Έχουν δοσομετρηθεί μονόμετρες αραιώσεις δύο δειγμάτων πλάσματος σε υψηλή συγκέντρωση αγγειοτονίνης I πραγματοποιημένες στο βαθμονομητή μηδέν.

Αραιώση	Συγκέντρωση αναμενόμενη, ng/mL	Συγκέντρωση μετρημένη, ng/mL	% Ανάκτησης
άθικτο	–	17,5	–
1:2	8,75	8,6	98,3
1:4	4,38	4,5	102,9
1:8	2,19	2,3	105,1
1:16	1,09	1,1	100,6
άθικτο	–	8,5	–
1:2	4,25	4,4	103,5
1:4	2,13	2,2	103,5
1:8	1,06	1,1	103,5
1:16	0,53	0,5	94,1

Τεστ ανάκτησης. Έχουν δοσομετρηθεί δύο δείγματα πλάσματος με χαμηλή συγκέντρωση αγγειοτονίνης I, τόσο άθικτο όσο και αφού έχουν προστεθεί αυξανόμενες ποσότητες αγγειοτονίνης I.

Συγκέντρωση προστιθέμενη, ng/mL	Συγκέντρωση αναμενόμενη, ng/mL	Συγκέντρωση μετρημένη, ng/mL	% Ανάκτησης
–	–	11,2	–
1,5	7,1	7,0	98,6
5,0	10,6	10,7	100,9
25,0	30,6	30,0	98,0
–	–	15,6	–
1,5	9,3	9,1	97,8
5,0	12,8	12,2	95,3
25,0	32,8	30,7	93,6

10. ΟΡΙΑ ΤΗΣ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗΣ

Η κλινική σημασία του προσδιορισμού της πλάσματικής νεφρικής δραστηριότητας μπορεί να ακυρωθεί εάν εκτελεσθεί σε ασθενείς που δεν υπόκεινται σε ελεγχόμενες συνθήκες στάσης, εισφοράς νατρίου και καλίου, ή στους οποίους έχουν δοθεί φάρμακα όπως διουρητικά, κλονιδίνη, β-αναστολείς, οιστροπρογεστερονικά, περιφερικά αγγειοδιασταλτικά, που μεταβάλλουν την νεφρική έκκριση.

Η διάγνωση δεν θα πρέπει να διατυπώνεται με βάση το αποτέλεσμα μιας και μόνο δοσομέτρησης, αλλά αυτό θα πρέπει να αξιολογείται μαζί με άλλα κλινικά ευρήματα, διαγνωστικές διαδικασίες και υπό την κρίση του ιατρού.

Βακτηριακή μόλυνση ή επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ψύξης/απόψυξης των δειγμάτων μπορούν να μετατρέψουν τα αποτελέσματα της δοσομέτρησης.

Για να επιτευχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα χρειάζεται να ακολουθούνται πιστά οι οδηγίες χρήσεως και να κατέχεται μια κατάλληλη τεχνική χειρογνομία. Ειδικότερα, είναι σημαντική μια καλή ακρίβεια στις φάσεις ανασύστασης και διανομής των αντιδραστηρίων και σε εκείνες της αναρρόφησης.

Αποτελέσματα που δεν επαναλαμβάνονται οφείλονται κυρίως σε μεθοδολογικούς παράγοντες όπως για παράδειγμα:

- εναλλαγή στις κάψουλες ανάμεσα στα φιαλίδια
- χρήση του ίδιου άκρου μικροσύριγγας για τις αναλήψεις από διαφορετικά φιαλίδια ή από διαφορετικά δείγματα.
- φιαλίδια που έχουν αφεθεί ανοικτά για μακρές χρονικές περιόδους
- έκθεση των αντιδραστηρίων ή των δειγμάτων σε έντονη θερμότητα, ή σε ισχυρές πηγές βακτηριακής μόλυνσης.
- ακατάλληλη αναρρόφηση του μίγματος επώασης
- μόλυνση του άκρου των δοκιμαστικών σωλήνων με τον ιχνηθέτη ή με τα δείγματα
- τυχαίες διακυμάνσεις ή κακή συντήρηση του μετρητή γάμμα
- εναλλαγή των αντιδραστηρίων από διαφορετικές παρτίδες.

11. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Τα συστατικά του kit περιέχουν αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό. Από τη στιγμή που το αζίδιο του νατρίου μπορεί να δημιουργήσει αζίδια μολύβδου ή χαλκού στις σωληνώσεις, συνιστάται να αφήσετε να τρέξει άφθονο νερό στις αποχετεύσεις έπειτα από την αποβολή διαλυμάτων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Επιβλαβές κατά την κατάποση.

R 31 – Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται τοξικά αέρια.

S 28 – Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα, πλυθείτε αμέσως με άφθονο νερό.

S 45 – Σε περίπτωση ατυχήματος ή αν αισθανθείτε αδιαθεσία ζητήστε αμέσως αμέσως ιατρική συμβουλή (δείτε την ετικέτα αν είναι δυνατό)

PMSF (Council Directive 99/45/EC)

R 22 – Επιβλαβές κατά την κατάποση.

R 36/38 – Ερεθίζει τα μάτια και το δέρμα.

S 45 – Σε περίπτωση ατυχήματος ή αν αισθανθείτε αδιαθεσία ζητήστε αμέσως αμέσως ιατρική συμβουλή (δείτε την ετικέτα αν είναι δυνατό).

Αιθανόλη (Council Directive 99/45/EC):

R 11 – Εύφλεκτο.

S 7 – Διατηρείτε το δοχείο καλά κλειστό.

S 16 – Διατηρείτε μακριά από φλόγες και σπινθήρες. Μην καπνίζετε.

Όλες οι μονάδες ορού και πλάσματος που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των συστατικών αυτού του kit έχουν αναλυθεί και έχει βρεθεί ότι δεν έχουν καμία αντιδραστικότητα με HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 και anti-HIV-2. Παρόλα αυτά δεδομένου του ότι καμία μέθοδος δεν μπορεί να δώσει απόλυτη σιγουριά για το ότι απουσιάζουν παθογόνοι παράγοντες, όλο το υλικό ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να θεωρείται ως δυνητικώς μολυσματικό και επομένως θα πρέπει να τυχαίνει κατάλληλης μεταχείρισης.

12. ΚΑΝΟΝΕΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

- Μην τρώτε, πίνετε, καπνίζετε ή χρησιμοποιείτε καλλυντικά κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της δοσομέτρησης.
- Μην πραγματοποιείτε αναρρόφηση με το στόμα.
- Αποφεύγετε την άμεση επαφή με τα υλικά που ενδεχομένως να είναι μολυσμένα, φορώντας κατάλληλη ένδυση εργαστηρίου, προστατευτικά γυαλιά και γάντια μίας χρήσεως. Πλένετε προσεκτικά τα χέρια στο τέλος της δοσομέτρησης.
- Αποφεύγετε να προκαλείτε πιτσιλιές ή αεροζόλ. Κάθε σταγόνα βιολογικού αντιδραστηρίου πρέπει να αποβάλλεται με ένα διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5% και το χρησιμοποιούμενο μέσο θα πρέπει να τυγχάνει μεταχείρισης κατάλληλης για μολυσμένα απόβλητα.
- Όλα τα δείγματα, όλα τα βιολογικά αντιδραστήρια του kit και όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση της δοσομέτρησης θα πρέπει να θεωρούνται ικανά να μεταδώσουν μολυσματικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό τα απόβλητα πρέπει να διατεθούν σύμφωνα με τις νομοθετικές διατάξεις και τους ισχύοντες κανονισμούς κάθε Κράτους. Τα υλικά μίας χρήσεως θα πρέπει να αποτεφρώνονται. Τα υγρά απόβλητα θα πρέπει να απολυμαίνονται με υποχλωριώδες νάτριο σε μία τελική συγκέντρωση της τάξεως του 5 % για τουλάχιστον μισή ώρα. Οποιοδήποτε υλικό που πρέπει να επαναχρησιμοποιηθεί θα πρέπει να τίθεται σε κλίβανο με μια προσέγγιση *overkill* (USP 24, 2000, p. 2143). Γενικά θεωρείται ότι μία ώρα στους 121°C είναι ένας επαρκής χρόνος αποστείρωσης. Παρόλα αυτά συνιστούμε σε κάθε χρήστη να επιβεβαιώνεται σχετικά με την αποτελεσματικότητα του κύκλου απολύμανσης μέσω μιας αρχικής επικύρωσης και την χρήση .σε βάση ρουτίνας, βιολογικών δεικτών.

13. ΒΑΣΙΚΟΙ ΚΑΝΟΝΕΣ ΡΑΔΙΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

Αντιδραστήρια που περιέχουν ιώδιο 125

Το kit αυτό περιέχει ραδιενεργό υλικό το οποίο δεν υπερβαίνει τα 2,1 μCi (76 kBq) σε ιώδιο 125. Κατά τη φύλαξη, το χειρισμό και τη διάθεση του υλικού αυτού, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες προφυλάξεις και καλές εργαστηριακές πρακτικές.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από γενική άδεια:

Το παρόν ραδιενεργό υλικό μπορεί να ληφθεί, να αποκτηθεί, να κατέχεται και να χρησιμοποιείται μόνο από ιατρούς, κτηνίατρος που εξασκούν κτηνιατρική ιατρική, κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία και μόνο για κλινικές ή εργαστηριακές δοκιμές *in vitro* που δεν περιλαμβάνουν την εσωτερική ή εξωτερική χορήγηση του υλικού, ή της ακτινοβολίας αυτού, σε ανθρώπους και ζώα. Η παραλαβή, η απόκτηση, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά υπόκεινται στους κανονισμούς και τη γενική άδεια της Ρυθμιστικής Επιτροπής Πυρηνικών των Η.Π.Α. (NRC) της πολιτείας στην οποία η επιτροπή έχει συνάψει συμφωνία για την άσκηση καθηκόντων αρμόδιας αρχής.

1. Η φύλαξη του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να περιοριστεί σε ειδικά επισήμασμένο χώρο.
2. Η πρόσβαση σε ραδιενεργά υλικά πρέπει να περιοριστεί μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό.
3. Μη χρησιμοποιείτε πιπέτα με το στόμα σε ραδιενεργά διαλύματα.
4. Μην τρώτε ή πίνετε εντός των χώρων εργασίας που έχουν επισημανθεί ως ραδιενεργοί.
5. Οι περιοχές, όπου ενδεχομένως έχουν προκληθεί εκχύσεις, θα πρέπει να σκουπιστούν και κατόπιν να πλυθούν με αλκαλικό απορρυπαντικό ή ραδιολογικό απολυμαντικό διάλυμα. Τυχόν υάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να εκπλυθούν καλά με νερό πριν από την πλύση άλλων εργαστηριακών υάλινων σκευών.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από ειδική άδεια:

Η παραλαβή, η χρήση, η μεταφορά και η διάθεση των ραδιενεργών υλικών υπόκεινται στους κανονισμούς και τις συνθήκες της ειδικής άδειάς σας.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Η ραδιενέργεια που αναγράφεται στο ένθετο συσκευασίας μπορεί να διαφέρει ελαφρώς από τη ραδιενέργεια που αναγράφεται στην ετικέτα συσκευασίας ή στην ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη. Η ετικέτα συσκευασίας και η ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη υποδεικνύουν την πραγματική ποσότητα ραδιενέργειας κατά την ημερομηνία βαθμονόμησης, ενώ το ένθετο συσκευασίας υποδεικνύει τη θεωρητική ραδιενέργεια του kit.

ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗΣ

- 1 - ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΤΕ ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ.
- 2 - ΕΚΤΕΛΕΣΤΕ ΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΓΓΕΙΟΤΟΝΙΝΗΣ Ι ΓΙΑ 90 min ΣΤΟΥΣ 37°C ΣΕ ΜΗ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΟΥΣ ΣΩΛΗΝΕΣ.
- 3 - ΣΗΜΕΙΩΣΤΕ ΕΙΣ ΔΙΠΛΟΥΝ ΤΟΥΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΟΥΣ ΣΩΛΗΝΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗ ΡΙΑ.
- 4 - ΔΙΑΝΗΜΕΤΕ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟ ΑΚΟΛΟΥΘΟ ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΚΑΙ ΑΝΑΚΙΝΗΣΤΕ ΤΟ ΜΙΓΜΑ ΕΠΩΑΣΗΣ:

ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΟΙ ΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	CAL 0-5	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΑΙ ΛΕΥΚΑ
ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ	50 μ L	–
ΔΕΙΓΜΑΤΑ	–	50 μ L
ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ	500 μ L	500 μ L

- 5 - ΑΦΗΣΤΕ ΓΙΑ ΕΠΩΑΣΗ ΑΠΟ 3 ΕΩΣ 24 ΩΡΕΣ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ.
- 6 - ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΤΕ ΕΠΙΜΕΛΩΣ ΤΟ ΜΙΓΜΑ ΕΠΩΑΣΗΣ.
- 7 - ΜΕΤΡΗΣΤΕ ΤΗ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΩΝ ΣΩΛΗΝΩΝ.

**REFERENCES/BIBLIOGRAFIA/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/REFERÊNCIAS/IRODALOM/
SEZNAM LITERATURY/BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

A.E. FREEDLENDER, T.L. GOODFRIEND

Renin and the angiotensins.

In: «Methods of hormone radioimmunoassay», B.M. Jaffe, H.R. Behrman eds., Academic Press, New York, p. 889 (1979).

T.L. GOODFRIEND, D.L. BALL

Angiotensins and renin.

In: «Handbook of radioimmunoassay», G.E. Abraham ed., M. Dekker Inc., New York, p. 551 (1977).

J.H. LARAGH, J.E. SEALEY

The renin-aldosterone axis for blood pressure, electrolyte homeostasis and diagnosis of high blood pressure.

In: «Textbook of endocrinology», R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p. 1064 (1981).

R. MALVANO et al.

Measurement of plasma renin activity by angiotensin I radioimmunoassay. I: an assessment of some methodological aspects. J. Nucl. Biol. Med., **16** : 24 (1972).

R. MALVANO et al.

Problems connected with the analytical blank in plasma renin activity measurements by angiotensin I radioimmunoassay. Clin. Chim. Acta, **50** : 161 (1974).

SALVETTI et al.

The clinical significance of renin and aldosterone.

Sorin Monograph of Immunology no. 4 (1981).



DiaSorin Inc.
1951 Northwestern Avenue
P.O. Box 285
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.
Phone: 651-439-9710
FAX: 651-351-5669

APM0135



DiaSorin S.p.A.,
13040 Saluggia (VC) Italy

34694 7/10