



Renin-EASIA

KAP1531

Read entire protocol before use.

RENIN-EASIA

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the *in vitro* quantitative determination of active Renin in human plasma .

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource Renin-EASIA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP1531 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

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

III. CLINICAL BACKGROUND

Renin, a polypeptidic enzyme (MW~ 40000) (1) also known as angiotensinogenase, is a circulating protease secreted by juxtaglomerular cells in the juxtaglomerular apparatus of the kidneys in response to low blood volume or low body NaCl content.

Renin activates the renin-angiotensin system by cleaving angiotensinogen produced in the liver into angiotensin I (inactive) which is further converted into angiotensin II (active) in the vascular epithelium of the lung. Angiotensin II can cause vasoconstriction by stimulating the central nervous system, in addition it stimulates ADH (antidiuretic hormone) secretion and aldosterone secretion from the adrenal gland (6).

Regulation of blood pressure and renal glomerular filtration control (2) are the most important functions of renin -angiotensin system.

Plasmatic concentration of renin is influenced by concentration of circulating angiotensinogen and subsequently the concentration of angiotensin II. High plasmatic levels of angiotensin II reduce renin secretion (negative feed back).

Determination of renin plasma levels is useful in the diagnosis of hypertension and in the therapeutic follow up of hypertensive patients (3).

Plasmatic concentration of renin decreases in patients with hypertension due to a primary hyperaldosteronism (4), contrary to renovascular hypertension (5) where concentrations of renin and aldosterone are both elevated.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DIAsource Renin-EASIA is a solid phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay performed on microtiterplates. Calibrators and samples react with the capture monoclonal antibody (MAb 1) coated on microtiter well and with a monoclonal antibody (MAb 2) labelled with horseradish peroxidase (HRP). After an incubation period allowing the formation of a sandwich: coated MAb 1 – human Renin – MAb 2 – HRP, the microtiterplate is washed to remove unbound enzyme labelled antibody. Bound enzyme-labelled antibody is measured through a chromogenic reaction. Chromogenic solution (TMB) is added and incubated. The reaction is stopped with the addition of Stop solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is proportional to the human Renin concentration. A calibration curve is plotted and Renin concentration in samples is determined by interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents			96 tests Kit	Color Code	Reconstitution
 Microtiterplate with 96 anti Renin monoclonal antibodies coated breakable wells			96 wells	blue	Ready for use
Ab	HRP	CONC	1 vial 0.05 ml	yellow	To be diluted with conjugate buffer (see on the label for the exact dilution factor)
Conjugate: HRP labelled anti-Renin (monoclonal antibodies) in TRIS buffer with bovine serum albumin and thymol					
CONJ	BUF		1 vial 10.5 ml	red	Ready for use
Conjugate buffer: Tris buffer with bovine serum albumin and thymol					
CAL	N		6 vials lyophilized	yellow	Add 2 ml distilled water
Calibrators - N = 0 to 5 , in human serum and thymol. See exact value on vial labels.					
CONTROL	N		2 vials lyophilized	silver	Add 2 ml distilled water
Controls - N = 2 in human serum with thymol.					
WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
Wash solution (Tris-HCl)					
CHROM	TMB		1 vial 12 ml	brown	Ready for use
Chromogenic TMB Solution (Tetramethylbenzidine)					
STOP	SOLN		1 vial 12 ml	white	Ready for use
Stop solution: HCl 1.0 N					

Note: 1. Use the zero calibrator for sample dilution.
2. 1 pg of the calibrator preparation is equivalent to 2.2 +/- 0.2 µIU of NIBSC 68/356.
Values obtained in pg/ml must be multiplied by 2.2 to obtain results in µIU/ml or mIU/l.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- High quality distilled water
- Pipettes for delivery of: 25 µl ,100 µl, 200 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Plastic tubes for dilution of samples
- Vortex mixer

- Magnetic stirrer
- Horizontal microtiterplate shaker capable of 400 rpm ± 100 rpm
- Washer for microtiterplates
- Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm, 490 nm and 650 nm (in case of polychromatic reading) or capable of reading at 450 nm and 650 nm (monochromatic reading)
- Optional equipment: The ELISA-AID™ necessary to read the plate according to polychromatic reading (see paragraph XI.A.) can be purchased from Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. REAGENT PREPARATION

- A. Calibrators:** Reconstitute the calibrators with 2 ml distilled water.
! For a complete solubilisation : after reconstitution, let the vials 30 min on a shaker, then vortex them.
- B. Controls:** Reconstitute the controls with 2 ml distilled water .
- C Working Renin-HRP conjugate :** Prepare an adequate volume of conjugate solution by diluting the concentrated Renin-HRP conjugate with conjugate buffer. See on the label for the exact dilution factor. Use a vortex to homogenize. Extemporaneous preparation is recommended.
- D. Working Wash solution :** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, the calibrators and controls are unstable, use them immediately after reconstitution, freeze them immediately in aliquots and keep them at –20°C for maximum 6 weeks. They are stable after 1 freeze-thaw cycle .
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Samples must be EDTA plasma.
- If the test is not run within 4 h , plasma should be aliquoted and stored at –20°C.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Do not use haemolysed samples.

X. PROCEDURE

- A. Handling notes**
Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
Respect the incubation times.
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.
During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

- B. Procedure**
- Select the required number of wells for the run. The unused wells should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
 - Secure the wells into the holding frame.
 - Pipette 200 µl of each calibrator, control and sample into the appropriate wells.
 - Incubate for 1 hour at room temperature on a horizontal shaker set at 400 rpm ± 100 rpm.
 - Aspirate the liquid from each well.
 - Wash the plate 3 times

7. Pipette 100µl working anti-Renin-HRP conjugate into all the wells.
8. Incubate for 1 hour at room temperature on a horizontal shaker set at 400 rpm $\pm$ 100 rpm.
9. Aspirate the liquid from each well.
10. Wash the plate 3 times .
11. Pipette 100 µl of the Chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
12. Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature, avoid direct sunlight
13. Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
14. Read at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section XI

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. On semi-logarithmic or linear graph paper plot the OD values (ordinate) for each calibrator against the corresponding concentration of Hu Renin (abscissa) and draw a calibration curve through the calibrator points by connecting the plotted points with straight lines.
4. Read the concentration for each control and sample by interpolation on the calibration curve.
5. Computer assisted data reduction will simplify these calculations. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.

XII. TYPICAL DATA

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

Hu Renin-EASIA		OD units
Calibrator		
	0 pg/ml	0.074
	3.9 pg/ml	0.121
	11 pg/ml	0.2
	55 pg/ml	0.68
	91 pg/ml	1.068
	270 pg/ml	2.6

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty four zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations above the average OD at zero binding, was 0.8 pg/ml.

B. Specificity

The Cross-reactivity of Prorenin in this Renin EASIA assay was determined by adding various concentrations of Prorenin to a plasma matrix and by measuring the apparent Renin response. Prorenin cross-reactivity was found to be 0.2 %.

C. Hemoglobin and bilirubin interferences

Hemoglobin at 7.5 mg/ml and bilirubin at 0.2 mg/ml were tested in Dia source Renin EASIA kit. Results are shown in the table below. No significant interference was found with bilirubin, but hemolytic samples should be avoided.

sample	Renin value (pg/ml)	Renin value + Hemoglobin (pg/ml)	Renin value + Bilirubin (pg/ml)
Plasma 1	12.8	7.5	13.1
Plasma 2	62.7	41.0	60.0
Plasma 3	10.8	7.1	11.7

D Precision

INTRA ASSAY				INTER ASSAY			
Sample	N	<X> $\pm$ SD (pg/ml)	CV (%)	Sample	N	<X> $\pm$ SD (pg/ml)	CV (%)
A	22	16.7 $\pm$ 0.9	5.4	A	10	16.8 $\pm$ 1.1	6.2
B	24	67.3 $\pm$ 1.5	2.2	B	10	64.6 $\pm$ 2.2	3.3

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

E Accuracy

RECOVERY TEST

Sample	Added Renin (pg/ml)	Recovered Renin (pg/ml)	Recovery (%)
Serum	37.1	38.0	102.4
	78.0	62.0	79.5
	131.2	109.1	83.2
	228.5	241.5	105.7

DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)
1	1/1	-	103.8
	1/2	53.6	51.9
	1/4	24.2	25.9
	1/8	11.1	12.9
2	1/1	-	105.8
	1/2	52.9	51.6
	1/4	26.4	26.6
	1/8	13.2	13.8
	1/16	6.6	5.5

Samples were diluted with zero calibrator.

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls which contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- It is recommended that Controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls.
- It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer.

XV. REFERENCE INTERVALS

Normal range has been determined on EDTA plasma of 60 apparently healthy subjects, fasting, aged from 20 to 60:40 males and 20 females, without oestrogen-progesterone treatment and without treatment for hypertension. For each subject, two blood samples were taken: one after 1 hour of activity in an upright position and another after remaining in a supine position for one hour.

Range limits are fixed from 5 to 95 percentile

Upright 0.1 – 25.5 pg/ml
Supine 0.1 – 9.7 pg/ml

Each laboratory should establish its own normal range of values.

Be careful many factors can influence renin levels (age, posture, estrogen treatment, antihypertensive medication,...)

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains H2SO4. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVII. BIBLIOGRAPHY

- (1) Primary structure of the human Renin gene : Hardman J.A; and al. ; DNA (1984): 3(6):457-468.
- (2) Control of glomerular filtration rate by rennin-angiotensin system : Hall J. E. and al; Am.J.Physiol. (1977) : 233(5) :F366-F372
- (3) Raised aldosterone to renine ratio predicts antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study : Lim P.O. and al ; Br. J. Clin. Pharmacol. (1999) : 48(5) :756-760 .
- (4) Screening of primary aldosteronism :Schirpenbach C. and al ; Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.(2006) : 20(3) : 369-384 .
- (5) Diagnostic procedure in renovascular hypertension :Distler A. and al. Clinical nephrology (1991) :36(4):174-180
- (6) Circulating and tissue angiotensin systems :Campbell D.J. ; J. Clin . Invest. (1987) :79(1) :1-6

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (µl)	SAMPLE(S) CONTROLS (µl)
Calibrators (0-6) Controls, Samples	200 -	- 200
Incubate for 1 hour at room temperature with continuous shaking at 400 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 µl of Wash Solution and aspirate.		
Anti Renin Conjugate	100	100
Incubate for 1 hour at room temperature with continuous shaking at 400 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 400 µl of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 30 min at room temperature.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader. Record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm).		

DIAsource Catalogue Nr : KAP1531	P.I. Number : 1700482/en	Revision nr : 131029/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2013-10-29

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

RENIN-EASIA

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage immuno-enzymatique pour la mesure quantitative *in vitro* de la rénine active dans le plasma humain.

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource Renin-EASIA kit
- B. **Numéro de catalogue :** KAP1531 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2 B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

La rénine, une enzyme polypeptidique (PM ~ 40000) (1) également connue sous le nom d'angiotensinogénase, est une protéase circulante sécrétée par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire du rein en réponse à un volume sanguin bas ou un contenu corporel en NaCl faible.

La rénine active le système rénine-angiotensine en clivant l'angiotensinogène produit par le foie en angiotensine I (inactive) qui est ensuite elle-même convertie en angiotensine II (active) dans l'épithélium vasculaire du poumon. L'angiotensine II peut provoquer une vasoconstriction par stimulation du système nerveux central. De plus, elle stimule la sécrétion d'ADH (hormone antidiurétique) et de l'aldostérone par la glande surrénale. (6)

La régulation de la pression sanguine et le contrôle de la filtration glomérulaire (2) sont les fonctions les plus importantes du système rénine-angiotensine.

La concentration plasmatique en rénine est influencée par la concentration en angiotensinogène circulant et, par la suite, par la concentration en angiotensine II. Des taux plasmatiques élevés en angiotensine II réduisent la sécrétion de rénine (rétrocontrôle négatif).

La détermination des taux plasmatiques de la rénine est utile dans le diagnostic de l'hypertension et le suivi thérapeutique des patients hypertendus (3).

La concentration plasmatique en rénine diminue chez les patients ayant une hypertension due à un hyperaldostéronisme primaire (4), contrairement à l'hypertension rénovasculaire (5) où les concentrations en rénine et en aldostérone sont toutes les deux élevées.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

La DIASource Renin-EASIA est une « Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay » en phase solide effectuée sur des microplaques. Les calibrateurs et les échantillons réagissent avec l’anticorps de capture monoclonal (AcM 1) recouvrant les puits et avec un anticorps monoclonal (AcM 2) marqué avec la peroxydase (HRP). Après une période d’incubation permettant la formation d’un sandwich: AcM 1 tapissé – Rénine humaine – AcM 2 – HRP, la microplaque est lavée afin d’enlever l’anticorps libre marqué enzymatiquement. L’anticorps lié marqué enzymatiquement est mesuré avec une réaction chromogénique. Une solution chromogénique (TMB) est ajoutée et incubée. La réaction est arrêtée avec l’addition de Solution d’arrêt et la microplaque est alors lue à la longueur d’onde appropriée. La quantité de remplacement de substrat est déterminée colorimétriquement par la mesure de l’absorbance, qui est proportionnelle à la concentration en Rénine humaine. Une courbe de calibration est dessinée et la concentration en Rénine dans les échantillons est déterminée par interpolation de la courbe de calibration.

V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs			96 tests Kit	Code Couleur	Reconstitution
 Plaques de microtitration sécable avec 96 puits recouvert d'anti Rénine (anticorps monoclonal)			96 puits	bleu	Prêt à l'emploi
Ab HRP CONC Conjugué: anti-Rénine marqué avec de l'HRP (anticorps monoclonal) dans un tampon TRIS avec de la sérum albumine bovine et du thymol			1 flacon 0,05 ml	Jaune	À diluer avec le tampon du conjugué (voir l'étiquette pour le facteur exact de dilution)
CONJ BUF Tampon du conjugué: un tampon TRIS avec de l'albumine bovine et du thymol			1 flacon 10,5 ml	Rouge	Prêt à l'emploi
CAL N Calibrateur N = 0 à 5, dans du sérum humain et du thymol Valeurs exactes sur chaque flacon.			6 flacons lyophilisés	Jaune	Ajouter 2 ml d'eau distillée
CONTROL N Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et du thymol			2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 2 ml d'eau distillée
WASH SOLN CONC Solution de Lavage (Tris-HCl)			1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
CHROM TMB Solution Chromogène TMB (Tetramethylbenzidine)			1 flacon 12 ml	Brun	Prêt à l'emploi
STOP SOLN Solution d'arrêt: HCl 1,0 N			1 flacon 12 ml	Blanc	Prêt à l'emploi

Note :

- Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons.
- 1 pg de la préparation du calibrateur est équivalent à 2,2 +/- 0,2 µUI de NIBSC 68/356. Les valeurs obtenues en pg/ml doivent être multipliées par 2,2 pour obtenir les résultats en µUI/ml ou mUI/l.

VI. MATÉRIELS NON FOURNIS

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

- Eau distillée d’une haute qualité
- Pipettes pour distribuer: 25 µl, 100 µl, 200 µl et 1 ml (l’utilisation de pipettes précises et de pointes en plastique est recommandée)
- Des tubes en plastique pour la dilution des échantillons
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Agitateur de microplaques horizontal capable de 400 tpm ± 100 tpm
- Laveur de microplaques
- Lecteur de microplaques capable de lire à 450 nm, 490 nm et 650 nm (en cas de lecture polychromatique) ou capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture monochromatique)
- Equipement supplémentaire: le ELISA-AID™ nécessaire à lire la plaque selon la lecture polychromatique (voir paragraphe XI.A.) peut être acheté chez Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- A. Calibrateurs : Reconstituer les calibrateurs avec 2 ml d’eau distillée. **! Pour une solubilisation complète : après reconstitution, laisser les flacons 30 min. sur un agitateur et, ensuite, les passer au vortex.**
- B. Contrôles : Reconstituer les contrôles avec 2 ml d’eau distillée.
- C. Conjugué Rénine-HRP de travail: Préparer un volume adéquat de conjugué de travail en diluant le conjugué rénine-HRP concentré avec le tampon du conjugué. Voir l’étiquette pour le facteur exact de dilution. Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Il est recommandé de faire une dilution extemporanée.
- D. Solution de Lavage : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 199 volumes d’eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (200x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D’EXPIRATION DES RÉACTIFS

- Avant l’ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu’à la date d’expiration, indiquée sur l’étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont instables. Les utiliser immédiatement après reconstitution, les congeler immédiatement en aliquotes et les maintenir à -20°C pendant maximum 6 semaines. Ils sont stables après 1 cycle de congélation-décongélation.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Des altérations dans l’apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PRÉPARATION ET STABILITÉ DE L’ÉCHANTILLON

- Les échantillons doivent être du plasma prélevé sur EDTA.
- Si le test n’est pas réalisé dans les 4 heures, le plasma doit être aliquoté et conservé à -20°C.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Ne pas utiliser d’échantillons hémolysés

X. MODE OPÉRATOIRE

- A. Notes de manipulation
- Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d’expiration.
- Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Réaliser les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.
- Utiliser un récipient en plastic propre pour préparer la Solution de Lavage. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l’addition de chaque réactif et échantillon. Pour la distribution de la solution du chromogène et de la solution d’arrêt, éviter des pipettes avec des parties en métal.
- Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d’augmenter la précision.
- Respecter les temps d’incubation.
- Préparer une courbe d’étalonnage pour chaque nouvelle série d’expériences, ne pas utiliser les données d’expériences précédentes.
- Distribuer la solution du chromogène dans les 15 minutes après le lavage de la plaque de microtitration.
- Éviter exposition à la lumière du soleil lors de l’incubation avec la solution du chromogène.

B. Mode opératoire

- 1. Sélectionner le nombre de barrettes nécessaires pour le test. Les barrettes inutilisées doivent être cachetées de nouveau dans le sachet avec un dessiccateur et gardées à 2-8°C.
- 2. Placer les barrettes dans le support.
- 3. Pipeter 200 µl de chaque Calibrateur, Contrôle et Échantillon dans les puits appropriés.
- 4. Incuber pendant 1 heure à température ambiante sur un agitateur horizontal mis à 400 tpm ± 100 tpm.
- 5. Aspirer le liquide de chaque puits.
- 6. Laver la plaque 3 fois.
- 7. Pipeter 100 µl du conjugué Rénine-HRP de travail dans tous les puits.
- 8. Incuber pendant 1 heure à température ambiante sur un agitateur horizontal mis à 400 tpm ± 100 tpm.
- 9. Aspirer le liquide de chaque puits.
- 10. Laver la plaque 3 fois.
- 11. Pipeter 100 µl de la solution chromogène dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
- 12. Incuber la microplaque pendant 30 minutes à température ambiante, éviter exposition à la lumière du soleil.
- 13. Pipeter 100 µl de la Solution d'arrêt dans chaque puits.
- 14. Lire les absorbances à 450 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) endéans l'heure et calculer les résultats comme décrits dans la section XI.

XI. CALCUL DES RÉSULTATS

- 1. Lire la plaque à 450 nm contre un filtre de référence mis à 650 nm (ou 630 nm).
- 2. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- 3. Dessiner sur un graphique linéaire ou semi-logarithmique les valeurs d'OD (ordonnées) pour chaque calibrateur contre la concentration correspondante en rénine humaine (abscisses) et dessiner une courbe de calibration à l'aide des points de calibration, en connectant les points avec des lignes droites.
- 4. Lire la concentration pour chaque contrôle et échantillon par interpolation sur la courbe de calibration.
- 5. L'analyse informatique des données simplifiera les calculs. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.

XII. DONNÉES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe d'étalonnage.

Renin-EASIA		Unités OD
Calibrateur	0 pg/ml	0,074
	3,9 pg/ml	0,121
	11 pg/ml	0,2
	55 pg/ml	0,68
	91 pg/ml	1,068
	270 pg/ml	2,6

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES

A. Sensibilité

Vingt-quatre calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards au-dessus de la moyenne DO déterminée à la fixation zéro, était de 0,8 pg/ml.

B. Spécificité

La réactivité croisée de la prorénine dans l'essai Renin EASIA a été déterminée en ajoutant différentes concentrations en prorénine à une matrice de plasma et en mesurant la réponse apparente de la rénine. La réactivité croisée de la prorénine s'est avéré être de 0,2%.

C. Interférences de l'hémoglobine et de la bilirubine

L'hémoglobine à 7,5 mg/ml et la bilirubine à 0,2 mg/ml ont été testées avec la trousse Renin EASIA de Diasource. Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous. Aucune interférence significative n'a été trouvée avec la bilirubine, mais il faut éviter d'utiliser les échantillons hémolytiques.

échantillon	Valeur de la rénine (pg/ml)	Valeur de la rénine + hémoglobine (pg/ml)	Valeur de la rénine + bilirubine (pg/ml)
Plasma 1	12,8	7,5	13,1
Plasma 2	62,7	41,0	60,0
Plasma 3	10,8	7,1	11,7

D. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Échantillon	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Échantillon	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	22	16,7 ± 0,9	5,4	A	10	16,8 ± 1,1	6,2
B	24	67,3 ± 1,5	2,2	B	10	64,6 ± 2,2	3,3

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

E. Exactitude

TEST DE RECUPERATION			
Échantillon	Rénine ajoutée (pg/ml)	Rénine récupérée (pg/ml)	Récupération (%)
Sérum	37,1	38,0	102,4
	78,0	62,0	79,5
	131,2	109,1	83,2
	228,5	241,5	105,7

TEST DE DILUTION			
Echantillon	Dilution	Concent. théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)
1	1/1	-	103,8
	1/2	53,6	51,9
	1/4	24,2	25,9
	1/8	11,1	12,9
2	1/1	-	105,8
	1/2	52,9	51,6
	1/4	26,4	26,6
	1/8	13,2	13,8
	1/16	6,6	5,5

Les échantillon ont été dilués avec le calibrateur zéro.

XIV. CÔNTROLE DE QUALITÉ INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Des contrôles qui contiennent de l'azoture influenceront la réaction enzymatique et ne peuvent pas être utilisés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en duplicate des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.
- On recommande que les contrôles soient testés de façon routinière comme des échantillons inconnus pour mesurer la variabilité du test. La réalisation du test doit être suivie avec des fichiers de contrôle de qualité des contrôles.
- On recommande de vérifier visuellement la courbe sélectionnée par l'ordinateur.

XV. VALEURS ATTENDUES

La fourchette des valeurs normales a été déterminée sur du plasma sur EDTA de 60 sujets apparemment sains, à jeun, âgés de 20 à 60 ans, 40 hommes et 20 femmes sans traitement œstrogéno-progestatif et sans traitement pour de l'hypertension. Deux échantillons de sang ont été prélevés pour chacun des sujets: une après une heure d'activité en position debout et une autre après que le sujet soit resté allongé sur le dos pendant une heure.

Les limites de la fourchette ont été fixées entre les percentiles 5 et 95.

Debout 0,1 – 25,5 pg /ml
Allongé sur le dos 0,1 – 9,7 pg /ml

Chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.
Être prudent: de nombreux facteurs peuvent influencer les taux de rénine (âge, position, traitement aux œstrogènes, médication antihypertensive,...)

XVI. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité
Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.
Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l’Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l’anti-HCV, l’anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d’hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l’ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.
Éviter le contact de la peau avec tous les réactifs, la solution d'arrêt contient du HCl. En cas de contact, laver avec beaucoup d’eau.
Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

(1) Primary structure of the human Renin gene : Hardman J.A; and al. ; DNA (1984): 3(6):457-468.
(2) Control of glomerular filtration rate by rennin-angiotensin system : Hall J. E. and al; Am.J.Physiol. (1977) : 233(5) :F366-F372
(3) Raised aldosterone to renine ratio predicts antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study : Lim P.O. and al ; Br. J. Clin. Pharmacol. (1999) : 48(5) :756-760 .
(4) Screening of primary aldosteronism :Schirpenbach C. and al ; Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.(2006) : 20(3) : 369-384 .
(5) Diagnostic procedure in renovascular hypertension :Distler A. and al. Clinical nephrology (1991) :36(4):174-180
(6) Circulating and tissue angiotensin systems :Campbell D.J. ; J. Clin . Invest. (1987) :79(1) :1-6

XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	CALIBRATEURS (µl)	ÉCHANTILLON(S) CONTRÔLES (µl)
Calibrateurs (0-5) Contrôles, Échantillons	200 -	- 200
Incuber pendant 1 heure à température ambiante avec agitation continue à 400 tpm. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 400 µl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Conjugué anti-Rénine	100	100
Incuber pendant 1 heure à température ambiante avec agitation continue à 400 tpm. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 400 µl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Solution du chromogène	100	100
Incuber pendant 30 min à température ambiante.		
Solution d’arrêt	100	100
Lire sur un lecteur de microplaques. Enregistrer l’absorbance de chaque puits à 450 nm (contre 630 ou 650 nm).		

DIAsource Catalogue Nr : KAP1531	P.I. Number : 1700482/fr	Revision nr : 131029/2
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Date de révision : 2015-06-30

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

Renin -EASIA

I. USO DEL KIT

Kit immunoenzimatico per la determinazione quantitativa in vitro della Renina attiva in plasma umano.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource Renin-EASIA Kit
- B. Numero di catalogo:** KAP1531: 96 test
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

La renina, un enzima polipeptidico (MW~ 40000) (1) altrimenti denominato angiotensinogenasi, è una proteasi circolante la cui secrezione da parte delle cellule juxtaglomerulari site nell'apparato juxtaglomerulare del rene avviene in risposta ad un volume ematico ridotto o a una ridotta presenza di NaCl nell'organismo.

La renina attiva il sistema renina-angiotensina convertendo l'angiotensinogeno prodotto nel fegato in angiotensina I (inattiva) che viene a sua volta convertita in angiotensina II (attiva) nell'epitelio vascolare del polmone. L'angiotensina II può causare vasocostrizione agendo sul sistema nervoso centrale, nonché stimolare la secrezione di ADH (ormone antidiuretico) e quella di aldosterone da parte della ghiandola surrenale (6).

La regolazione della pressione arteriosa e il controllo della filtrazione glomerulare renale (2) costituiscono le principali funzioni del sistema renina-angiotensina.

La concentrazione plasmatica di renina è influenzata dalla concentrazione dell'angiotensinogeno circolante e conseguentemente dalla concentrazione di angiotensina II. Elevati livelli plasmatici di angiotensina II riducono la secrezione di renina (feedback negativo).

La determinazione dei livelli plasmatici di renina è utile nelle diagnosi di ipertensione e nel follow up terapeutico del paziente iperteso (3).

Nei pazienti con ipertensione dovuta a iperaldosteronismo primario (4) è evidenziabile una riduzione della concentrazione plasmatica di renina, contrariamente a quanto avviene in caso di ipertensione renovascolare (5) ove è riscontrabile un aumento sia dei livelli di renina che di aldosterone.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

DIAsource Renin-EASIA è un immunosaggio a sensibilità amplificata a fase solida eseguito su piastre di microtitolazione. I calibratori e i campioni reagiscono con la cattura dell'anticorpo monoclonale (MAb 1) che riveste il pozzetto di microtitolazione e con un anticorpo monoclonale (MAb 2) marcato con horseradish perossidasi (HRP). Dopo un periodo di incubazione che consenta la formazione di un sandwich: MAb 1 di rivestimento – Renina umano – MAb 2 – HRP, la piastra di microtitolazione viene lavata per rimuovere l'anticorpo marcato con enzima non legato. L'anticorpo marcato con enzima non legato viene misurato attraverso una reazione cromogenica. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza che è proporzionale alla concentrazione di Renina umano. Viene tracciata una curva di calibrazione e la concentrazione Renina nei campioni viene determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti separabili, rivestiti anti Renina (anticorpi monoclonali)	96 pozzetti	Blu	Pronte per l'uso
Ab HRP CONC Coniugato: marcato HRP anti-Renina (Anticorpi monoclonali) in tampone TRIS con albumina di siero bovino e timolo	1 flacone 0,05 ml	Giallo	Da diluire con il tampone del coniugato (consultare l'etichetta per calcolare il fattore di diluizione esatto)
CONJ BUF Tampone del coniugato: tampone TRIS con albumina di siero bovino e timolo	1 flacone 10,5 ml	Rosso	Pronto per l'uso
CAL N Calibratore 0-5, in siero umano con timolo. Le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi.	6 flaconi liofiliz.	Giallo	Aggiungere 2 ml di acqua distillata
CONTROL N Controlli: N = 1 o 2, in siero umano con timolo	2 flaconi liofiliz.	Argento	Aggiungere 2 ml di acqua distillata
WASH SOLN CONC Tampone di lavaggio (TRIS HCl)	1 flacone 10 ml	Bruno	Diluire 200 x con acqua distillata (usando un agitatore magnetico)
CHROM TMB CONC WASH Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	1 flacone 12 ml	Bruno	Pronto per l'uso
STOP SOLN Soluzione di arresto: HCl 0,1N	1 flacone 12 ml	Bianco	Pronto per l'uso

Note: Usare zero Calibratore per diluire i campioni.
1 pg dela calibratore preparazione è equivalente a 2,2 +/- 0,2 µIU NIBSC 68/356.
Valori ottenuti in pg/ml devono essere moltiplicati per 2,2 alfine di ottenere risultati in µIU/ml o mIU/l.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

- Acqua distillata di qualità elevata
- Pipette per dispensare 25 µl, 100 µl, 200 µl e 1 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
- Provette di plastica per la diluizione dei campioni.
- Agitatore tipo vortex.
- Agitatore magnetico.
- Agitatore orizzontale per piastre da microtitolazione, che raggiunga 400 rpm ± 100 rpm

- Lavatrice per piastra di microtitolazione
- Letto di piastre per microtitolazione con letture a 450-490 e 650 nm (in caso di lettura policromatica) o con letture a 450 e 650 nm (lettura monocromatica)
- Strumentazione opzionale: ELISA-AID™ necessario per la lettura policromatica delle piastre (vedi paragrafo XI.A.) può essere acquistato presso Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire i calibratori con 2 ml di acqua distillata.
! Per una solubilizzazione completa: dopo la ricostituzione, lasciare le provette su un agitatore per 30 minuti, quindi vortexarle.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 2 ml di acqua distillata.
- C. Soluzione di lavoro del coniugato Renina-HRP:** Preparare la quantità necessaria di soluzione del coniugato diluendo il coniugato Renina-HRP concentrato con il tampone del coniugato. Consultare l'etichetta per calcolare il fattore di diluizione esatto. Utilizzare un vortex per omogeneizzare. Si raccomanda la preparazione estemporanea.
- D. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, calibratori e controlli sono molto instabili, utilizzarli immediatamente dopo ricostituzione, congelarli immediatamente in aliquote e mantenerli a -20°C per 6 settimane. Rimangono stabili dopo un ciclo di congelamento/scongelamento.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- I campioni devono essere costituiti da plasma trattato con EDTA.
- Qualora il test non dovesse essere effettuato entro 4 ore, il plasma dovrà essere suddiviso in aliquote e conservato a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.
- Non usare campioni emolizzati.

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. Avvertenze generali**
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.
Non mescolare reattivi di lotti diversi.
Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.
Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.
Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.
Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
Per la distribuzione della soluzione cromogena e la Stop Solution evitare pipette con parti metalliche.
L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.
Rispettare i tempi di incubazione.
Allestire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di calibrazione di sedute analitiche precedenti.
Distribuzione della soluzione cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.
Durante l'incubazione con la soluzione cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

- B. Metodo del dosaggio**
- Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce reagenti inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8°C.
 - Assicurare le strisce reagenti nel telaio di supporto.

3. Pipettare 200 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
4. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente su un agitatore orizzontale impostato a 400 rpm ± 100 rpm.
5. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
6. Lavare la piastra 3 volte.
7. Pipettare 100 µl della soluzione di lavoro del coniugato Renina-HRP in tutti i pozzetti.
8. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente su un agitatore orizzontale impostato a 400 rpm ± 100 rpm.
9. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
10. Lavare la piastra 3 volte.
11. Pipettare in ogni pozzetto 100 µl di Soluzione Cromogena entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
12. Incubare la piastra di microtitolazione per 30 minuti a temperatura ambiente; evitare la luce diretta del sole.
13. Pipettare 100 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
14. Leggere le assorbanze a 450 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro un’ora e calcolare i risultati come descritto nella sezione XI.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento regolato a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
3. Costruire la curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica o lineare ponendo in ordinata le medie dei OD dei replicati degli standard e in ascissa le rispettive concentrazioni di Renina umano, collegando i punti tracciati con linee rette.
4. Determinare le concentrazioni e controlli per interpolazione sulla curva di taratura.
5. E’ possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I dati che seguono sono esclusivamente a scopo illustrativo e non devono essere in nessun caso utilizzati al posto della curva di taratura "real time".

Renin-EASIA		Unità OD
Calibratore	0 pg/ml	0,074
	3,9 pg/ml	0,121
	11 pg/ml	0,2
	55 pg/ml	0,68
	91 pg/ml	1,068
	270 pg/ml	2,6

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Ventiquattro replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard.
La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con OD pari alla media più 2 deviazioni standard di 16 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,8 pg/ml.

B. Specificità

In questo test di dosaggio EASIA della Renina, la reattività crociata della Prorenina è stata determinata misurando la risposta apparente di Renina dopo aggiunta di varie concentrazioni di Prorenina a una matrice plasmatica. La reattività crociata della Prorenina è risultata pari allo 0,2%.

C. Interferenze con emoglobina e bilirubina

Mediante il kit Diasource Renin EASIA sono state analizzate l'emoglobina alla concentrazione di 7,5 mg/ml e la bilirubina a 0,2 mg/ml. I risultati sono mostrati nella tabella sotto riportata.
Non sono state osservate interferenze statisticamente significative con la bilirubina; tuttavia, si devono evitare i campioni emolitici.

Campione	Valore della renin (pg/ml)	Valore di renina + emoglobina (pg/ml)	Valore di renina + bilirubina (pg/ml)
Plasma 1	12,8	7,5	13,1
Plasma 2	62,7	41,0	60,0
Plasma 3	10,8	7,1	11,7

D. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Campione	N	<> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Campione	N	<> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	22	16,7 ± 0,9	5,4	A	10	16,8 ± 1,1	6,2
B	24	67,3 ± 1,5	2,2	B	10	64,6 ± 2,2	3,3

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

E. Accuratezza

TEST DI RECUPERO			
Campione	Renina aggiunta (pg/ml)	Renina recuperata (pg/ml)	Recupero (%)
Siero	37,1	38,0	102,4
	78,0	62,0	79,5
	131,2	109,1	83,2
	228,5	241,5	105,7

TEST DI DILUIZIONE			
Campione	Diluzione	Concentrazione teorica (pg/ml)	Concentrazione misurata (pg/ml)
1	1/1	-	103,8
	1/2	53,6	51,9
	1/4	24,2	25,9
	1/8	11,1	12,9
2	1/1	-	105,8
	1/2	52,9	51,6
	1/4	26,4	26,6
	1/8	13,2	13,8
	1/16	6,6	5,5

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. I controlli che contengono aze interferiscono con la reazione enzimatica e quindi non possono essere utilizzati.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.
- È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

XV. **INTERVALLI DI RIFERIMENTO**

L'intervallo normale è stato determinato su plasma in EDTA prelevato da 60 soggetti apparentemente sani, a digiuno, di età compresa tra 20 e 60 anni, di cui 40 soggetti di sesso maschile e 20 soggetti di sesso femminile, non in terapia con estrogeni-progesterone né in terapia con antipertensivi. A ogni soggetto sono stati prelevati due campioni di sangue: il primo dopo 1 ora di attività in posizione eretta e il secondo dopo 1 ora di permanenza a riposo in posizione coricata. Sono stati stabiliti quindi i limiti dell'intervallo dal 5° al 95° percentile:

posizione eretta 0,1 – 25,5 pg /ml
posizione supina 0,1 – 9,7 pg /ml

Ciascun laboratorio deve stabilire il proprio range di normalità.
Da tenere presente che i livelli di renina possono essere influenzati da diversi fattori (età, postura, terapia estrogenica, farmaci antipertensivi...)

XVI. **PRECAUZIONI PER L'USO**

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.
I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.
Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.
Evitare qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti, la soluzione di arresto contiene HCl. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.
Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

XVII. **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

(1) Primary structure of the human Renin gene : Hardman J.A; and al. ; DNA (1984): 3(6):457-468.
(2) Control of glomerular filtration rate by rennin-angiotensin system : Hall J. E. and al; Am.J.Physiol. (1977) : 233(5) :F366-F372
(3) Raised aldosterone to renine ratio predicts antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study : Lim P.O. and al ; Br. J. Clin. Pharmacol. (1999) : 48(5) :756-760 .
(4) Screening of primary aldosteronism :Schirpenbach C. and al ; Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.(2006) : 20(3) : 369-384 .
(5) Diagnostic procedure in renovascular hypertension :Distler A. and al. Clinical nephrology (1991) :36(4):174-180
(6) Circulating and tissue angiotensin systems :Campbell D.J. ; J. Clin . Invest. (1987) :79(1) :1-6

XVIII. **SCHEMA DEL DOSAGGIO**

	CALIBRATORE (µl)	CAMPIONI CONTROLLI (µl)
Calibratore (0 - 5) Controlli, Campioni	200 -	- 200
Incubare per 1 ora a temperatura ambiente sotto agitazione continua a 400 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Conjugato anti-Renina-HRP	100	100
Incubare per 1 ora a temperatura ambiente sotto agitazione continua a 400 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 400 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.		
Soluzione cromogena	100	100
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.		
Soluzione di arresto	100	100
Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione. Registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (rispetto a 630 o 650 nm) .		

Numero di catalogo di DIAsource: KAP1531	P.I. numero: 1700482/it	Revisione numero: 131029/2
--	----------------------------	-------------------------------

Data di revisione : 2015-06-30

Leer el protocolo completo antes de usar.

Renin-EASIA

I. INSTRUCCIONES DE USO

Ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa in vitro de Renina activa en plasma humano.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre:** DIASource Renin-EASIA Kit
- B. Número de Catálogo:** KAP1531 : 96 determinaciones
- C. Fabricado por:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para asistencia técnica e información sobre pedidos contactar:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTO CLÍNICO

La Renina, una enzima polipeptídica (PM ~ 40000) (1) conocida también como angiotensinogenasa, es una proteasa circulante secretada por las células yuxtaglomerulares en el aparato yuxtaglomerular de los riñones como respuesta a bajo volumen sanguíneo o bajo contenido de NaCl en el organismo.

La Renina activa el sistema renina-angiotensina dividiendo el angiotensinógeno producido en el hígado en Angiotensina I (inactiva) que a su vez es convertida en Angiotensina II (activa) en el epitelio vascular del pulmón. La Angiotensina II puede provocar vasoconstricción al estimular el sistema nervioso central, además estimula la secreción de la HAD (hormona anti diurética) y la secreción de aldosterona en la glándula suprarrenal.(6)

La regulación de la presión sanguínea y el control de la filtración glomerular (2) son las funciones más importantes del sistema renina-angiotensina.

La concentración plasmática de la renina está influenciada por la concentración del angiotensinógeno circulante y posteriormente por la concentración de la Angiotensina II. Niveles plasmáticos altos de Angiotensina II reducen la secreción de renina (retroalimentación negativa).

La determinación de los niveles plasmáticos de renina es útil en el diagnóstico de hipertensión y en el seguimiento terapéutico de los pacientes hipertensos (3).

La concentración plasmática de la renina disminuye en pacientes hipertensos debido a hiperaldosteronismo primario (4), al contrario de la hipertensión renovascular (5) donde tanto la concentración de la renina como la de aldosterona, están aumentadas.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El DÍAsource Renin-EASIA es un Inmunoensayo de fase sólida Enzimático de Sensibilidad Amplificada efectuado en microplacas. Los calibradores y las muestras reaccionan con el anticuerpo de captura monoclonal (MAb 1) que recubre los pocillos de la microplaca y con un anticuerpo monoclonal (MAb 2) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Después de un periodo de incubación que permite la formación de un “sándwich”: MAb 1 recubierto – Renina humana – MAb 2 – HRP, la microplaca se lava para eliminar los anticuerpos libres marcados con enzimas. Los anticuerpos marcados con enzimas que se han ligado se miden con una reacción cromogénica. La solución cromogénica (TMB) es añadida e incubada. La reacción se para con la adición de la Solución de Parada y después la microplaca se lee a la longitud de onda apropiada. La cantidad de recambio de sustrato es determinada de manera colorimétrica por la medición de la absorbancia, que es proporcional a la concentración de la Renina humana. Una curva de calibración es elaborada y la concentración de la Renina de las muestras es determinada por interpolación en la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos			Kit de 96 determinaciones	Código de Color	Reconstitución
 Microplaca con anti Renina (anticuerpos monoclonales) pocillos recubiertos desprendibles			96 pocillos	Azul	Listo para uso
Ab	HRP	CONC	1 vial 0,05 ml	amarillo	Debe ser diluido con tampón de conjugado (ver la etiqueta para comprobar el factor de dilución exacta)
Conjugado: anti Renina marcado con HRP (anticuerpos monoclonales) en tampón TRIS con albúmina de suero bovino y timol.					
CONJ		BUF	1 vial 10,5 ml	Rojos	Listo para uso
Tampón de Conjugado: tampón TRIS con albúmina de suero bovino y timol.					
CAL	N		6 viales liofilizados	amarillo	Añadir 2 ml de agua destilada
Calibradores N = 0 al 5, en suero humano con timol. Ver los valores exactos en las etiquetas de los viales.					
CONTROL		N	2 viales Liofilizados	plateado	Añadir 2 ml de agua destilada
Controles - N = 1 o 2 en suero humano con timol.					
WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 200 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
Solución de lavado (Tris-HCl)					
CHROM	TMB		1 vial 12 ml	marrón	Listo para uso
Solución Cromogénica TMB (Tetrametilbencidina)					
STOP	SOLN		1 vial 12 ml	blanco	Listo para uso
Solución de Parada: HCl 1,0 N					

Nota: 1. Use el calibrador cero para diluir muestras.
2. 1 pg de la preparación del calibrador es equivalente a 2,2 +/- 0,2 µIU de NIBSC 68/356.
Los valores obtenidos en pg/ml deben ser multiplicados por 2,2 para obtener resultados en µIU/ml o mIU/l.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit

1. Agua destilada de alta calidad
2. Pipetas de 25 µl, 100 µl, 200 µl y 1 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Tubos plásticos para dilución de las muestras.
4. Vortex
5. Agitador magnético
6. Agitador de microplacas horizontal capaz de 400 rpm ± 100 rpm
7. Lavador de microplacas
8. Lector de microplacas capaz de leer a 450 nm, 490 nm y 650 nm (en caso de lectura policromática) o capaz de leer a 450 nm y 650 nm (lectura monocromática)
9. Material opcional: el ELISA-AID™ necesario para leer la placa con la lectura policromática (vease párrafo XI.A.) puede ser comprado a Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituir los calibradores con 2 ml de agua destilada. **! Para que se disuelvan completamente: después de reconstituidos deje los viales por 30 min en un agitador luego mézclelos en un vortex.**
- B. **Controles:** Reconstituir los controles con 2 ml de agua destilada.
- C. **Conjugado de trabajo Renina –HRP:** Prepare un volumen adecuado de solución de conjugado diluyendo el conjugado Renina-HRP concentrado con tampón de conjugado. Ver la etiqueta para comprobar el factor de dilución exacto. Usar un agitador vortex para homogenizar. Se recomienda preparar en el momento de uso.
- D. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 199 partes de agua destilada con 1 parte de Solución de lavado (200x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Después de reconstituidos, los calibradores y controles son muy inestables, por lo que deben utilizarse inmediatamente después de la reconstitución, congelarse enseguida en partes alícuotas y mantenerse a –20° C durante 6 semanas. Son estables después de congelar y descongelar 1 vez.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras deben ser de plasma anticoagulado con EDTA.
- Si el ensayo no se realiza en 4 horas., el plasma debe ser alícuotado y almacenado a –20°C.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- No utilizar muestras hemolizadas.

X. PROCEDIMIENTO

- A. **Notas de manejo**
No utilizar el kit o componentes después de la fecha de caducidad.
No mezclar reactivos de diferente número de lote.
Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
Mezclar concienzudamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente.
Preparar los calibradores, controles y muestras en duplicado. Se recomienda la alineación vertical.
Usar un envase plástico limpio para preparar la Solución de Lavado.
Con el fin de evitar cualquier contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
Al dispensar la Solución Cromogénica y la Solución de Parada, evitar usar pipetas con partes metálicas.
El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorará la precisión.
Respetar los tiempos de incubación.
Preparar la curva de calibración para cada ensayo, no utilizar los datos de ensayos previos.
Dispensar la Solución Cromogénica dentro de los 15 minutos posteriores al lavado de las microplacas.

Durante la incubación con Solución Cromogénica, evitar exponer las microplacas la luz solar directa.

B. Procedimiento

1. Seleccionar el número requerido de pocillos para el ensayo. Los pocillos sin usar deben ser sellados en la bolsa con un desecante y guardados a 2-8°C.
2. Fijar los pocillos en el soporte.
3. Pipetear 200 µl de cada Calibrador, Control y Muestra en el pocillo apropiado.
4. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 400 rpm ± 100 rpm.
5. Aspirar el líquido de cada pocillo.
6. Lavar la placa 3 veces.
7. Pipetear 100 µl del conjugado de trabajo Renina-HRP en cada pocillo.
8. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador horizontal a 400 rpm ± 100 rpm.
9. Aspirar el líquido de cada pocillo.
10. Lavar la placa 3 veces.
11. Pipetear 100 µl de la solución cromogénica en cada pocillo dentro de los de 15 minutos después de la fase de lavado.
12. Incubar la microplaca durante 30 minutos a temperatura ambiente en posición horizontal, evitar la luz solar directa.
13. Pipetear 100 µl del Reactivo de Parada en cada pocillo.
14. Leer las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia 630 nm o 650 nm) en menos de 1 hora y calcular los resultados como se ha descrito en la sección XI

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Leer la placa a 450 nm contra un filtro de referencia a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcular el promedio de las determinaciones dobles.
3. Poner sobre un papel semi-logarítmico o linear los valores de la DO (ordenada) para cada calibrador contra la concentración de Renina humana correspondiente (abscisa) y construir la curva de calibración conectando los puntos de calibración con líneas rectas.
4. Leer la concentración para cada control y muestra por interpolación en la curva de calibración.
5. La reducción de datos asistida por ordenador puede facilitar estos cálculos. Si se utiliza el procesamiento de resultados automático, recomendamos el ajuste de la curva dada por la función logística de 4 parámetros.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados en vez de una calibración real.

Renin-EASIA		unidades DO
Calibrador	0 pg/ml	0,074
	3,9 pg/ml	0,121
	11 pg/ml	0,2
	55 pg/ml	0,68
	91 pg/ml	1,068
	270 pg/ml	2,6

XIII. FUNCIONAMIENTO Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Veinticuatro calibradores cero fueron medidos en una curva al mismo tiempo que un conjunto de otros calibradores. El límite de detección, se definió como la concentración aparente dos desviaciones estándares sobre la DO promedio cuando la unión es cero, fue de 0,8 pg/ml.

B. Especificidad

La reacción cruzada de la Prorenina en este ensayo Renin EASIA fue determinada agregando varias concentraciones de Prorenina a una matriz plasmática y midiendo la repuesta aparente de la Renina. La reactividad cruzada de Prorenina se determinó en 0,2%.

C. Interferencia de la bilirrubina y la hemoglobina

Hemoglobina a 7,5 mg/ml y bilirrubina a 0,2 mg/ml fueron analizadas con un kit Diasource Renin EASIA. Los resultados están en la tabla a continuación. No se encontró interferencia significativa con bilirrubina, pero las muestras hemolíticas deben evitarse.

muestra	Valor de renina(pg/ml)	Valor de renina + Hemoglobina (pg/ml)	Valor de renina + Bilirrubina(pg/ml)
Plasma 1	12,8	7,5	13,1
Plasma 2	62,7	41,0	60,0
Plasma 3	10,8	7,1	11,7

D. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO				PRECISIÓN INTER-ENSAYO			
Muestra	N	<X> ± DS (pg/ml)	CV (%)	Muestra	N	<X> ± DS (pg/ml)	CV (%)
A	22	16,7 ± 0,9	5,4	A	10	16,8 ± 1,1	6,2
B	24	67,3 ± 1,5	2,2	B	10	64,6 ± 2,2	3,3

DS : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

E. Exactitud

PRUEBA DE RECUPERACIÓN

Muestra	Renina añadido (pg/ml)	Renina recuperado (pg/ml)	Recuperación (%)
Suero	37,1	38,0	102,4
	78,0	62,0	79,5
	131,2	109,1	83,2
	228,5	241,5	105,7

PRUEBA DE DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (pg/ml)	Concent. Medida (pg/ml)
1	1/1	-	103,8
	1/2	53,6	51,9
	1/4	24,2	25,9
	1/8	11,1	12,9
2	1/1	-	105,8
	1/2	52,9	51,6
	1/4	26,4	26,6
	1/8	13,2	13,8
	1/16	6,6	5,5

Las muestras fueron diluidas con calibrador cero

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, cada laboratorio puede preparar sus propios grupos de muestras de control, las que deben almacenarse en alícuotas congeladas. Los controles que contienen azida interfieren con la reacción enzimática y no pueden ser utilizados.
- Los criterios de aceptación de las diferencias entre los resultados de los duplicados de las muestras deben depender de las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Recomendamos que los controles sean incluidos rutinariamente en los ensayos como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. El funcionamiento del ensayo debe ser controlado con gráficos de control de calidad de los controles.
- Recomendamos un control visual de la curva seleccionada por el ordenador.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

El rango normal se a determinado en plasma EDTA de 60 sujetos aparentemente sanos, en ayunas de edades entre 20 y 40 años: 40 hombres y 20 mujeres sin tratamiento de estrógeno-progesterona y sin tratamiento para la hipertensión. Se tomaron dos muestras de sangre de cada sujeto después de 1 hora de actividad realizada de pie y otra permaneciendo tumbado durante una hora.
Los límites del ámbito de medición se han fijado entre los percentiles 5 y 95.

De pie	0,1 – 25,5 pg /ml
Tumbado	0,1 – 9,7 pg /ml

Cada laboratorio debe establecer sus propios valores de rango normal. Tenga cuidado, muchos factores pueden influenciar los niveles de renina (edad, postura, tratamiento con estrógeno, medicamentos antihipertensivos,...)

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad
Sólo para uso de diagnóstico in vitro.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido examinados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA resultando negativos para HBsAg, anti-VHC, anti-VIH-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure totalmente que los derivados de la sangre humana no transmitirán hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras de suero o plasma se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.
Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Los componentes bovinos provienen de países donde la EEB (Encefalopatía Espongiforme Bovina) no ha sido informada. Sin embargo, los componentes que contienen sustancias animales deberán ser considerados como potencialmente infecciosos.
Evitar contacto de la piel con todos los reactivos, la Solución de Parada contiene HCl. En caso de contacto, lavar con abundante agua.
No fumar, beber, comer o utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes desechables.

XVII. BIBLIOGRAFIA

(1) Primary structure of the human Renin gene : Hardman J.A; and al. ; DNA (1984): 3(6):457-468.

(2) Control of glomerular filtration rate by rennin-angiotensin system : Hall J. E. and al; Am.J.Physiol. (1977) : 233(5) :F366-F372

(3) Raised aldosterone to renine ratio predicts antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study : Lim P.O. and al ; Br. J. Clin. Pharmacol. (1999) : 48(5) :756-760 .

(4) Screening of primary aldosteronism :Schirpenbach C. and al ; Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.(2006) : 20(3) : 369-384 .

(5) Diagnostic procedure in renovascular hypertension :Distler A. and al. Clinical nephrology (1991) :36(4):174-180

(6) Circulating and tissue angiotensin systems :Campbell D.J. ; J. Clin . Invest. (1987) :79(1) :1-6

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES (µl)	CONTROLES MUESTRA(S) (µl)
Calibradores (0 - 5) Controles, Muestras	200 -	- 200
Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua a 400 rpm. Aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar 3 veces con 400 µl de la Solución de Lavado y aspirar.		
Conjugado Renina	100	100
Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua a 400 rpm. Aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar 3 veces con 400 µl de la Solución de Lavado y aspirar.		
Solución Cromogénica	100	100
Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente		
Solución de Parada	100	100
Leer con un lector de microplacas. Registrar la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (contra 630 o 650 nm).		

DIAsource Catalogo Nro.: KAP1531	P.I. Numero: 1700482/es	Revisión nro.: 131029/1
-------------------------------------	----------------------------	----------------------------

Fecha de la revisión : 2013-10-29

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

Renin-EASIA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτικό προσδιορισμό της ενεργούς ρενίνης σε ανθρώπινο πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ Renin-EASIA της DAsource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KAP1531: 96 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Η ρενίνη, ένα πολυπεπτιδικό ένζυμο (MB~ 40000) (1), γνωστή επίσης ως αγγειοτασινογενάση, είναι μια κυκλοφορούσα πρωτεάση που εκκρίνεται από παρασπειραματικά κύτταρα στην παρασπειραματική συσκευή των νεφρών, ως απόκριση σε μειωμένο όγκο αίματος ή χαμηλή συγκέντρωση NaCL στο σώμα.

Η ρενίνη ενεργοποιεί το σύστημα ρενίνης-αγγειοτασίνης μετατρέποντας το παραγόμενο στο ήπαρ αγγειοτασινογόνο σε αγγειοτασίνη I (ανενεργή), η οποία κατόπιν μετατρέπεται σε αγγειοτασίνη II (ενεργή) στο αγγειακό επιθήλιο των πνευμόνων. Η αγγειοτασίνη II μπορεί να επιφέρει αγγειοσύσπαση μέσω διέγερσης του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επιπλέον διεγείρει την έκκριση ADH (αντιδιουρητική ορμόνη) και αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια (6).

Οι σημαντικότερες λειτουργίες του συστήματος ρενίνης-αγγειοτασίνης είναι η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και ο έλεγχος της νεφρικής σπειραματικής διήθησης (2).

Η συγκέντρωση της ρενίνης στο πλάσμα επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του κυκλοφορούντος αγγειοτασινογόνου και επομένως, από τη συγκέντρωση της αγγειοτασίνης II. Τα υψηλά επίπεδα αγγειοτασίνης II στο πλάσμα επιφέρουν μείωση της έκκρισης ρενίνης (αρνητική ανατροφοδότηση)

Ο καθορισμός των επιπέδων ρενίνης στο πλάσμα είναι χρήσιμος στη διάγνωση της υπέρτασης και στην παρακολούθηση της θεραπείας υπερτασικών ασθενών (3).

Η συγκέντρωση ρενίνης στο πλάσμα υπερτασικών ασθενών είναι μειωμένη λόγω πρωτοπαθούς υπεραλδοστερονισμού (4), σε αντίθεση με την νεφραγγειακή υπέρταση (5), όπου αυξάνονται οι συγκεντρώσεις τόσο της ρενίνης όσο και της αλδοστερόνης.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός Renin-EASIA της DIAsource είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός ενισχυμένης ευαισθησίας, στερεής φάσης, ο οποίος εκτελείται σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Οι βαθμονομητές και τα δείγματα αντιδρούν με το μονοκλωνικό αντίσωμα σύλληψης (MAb 1) που είναι επιστρωμένο στην υποδοχή της πλάκας μικροτιτλοδότησης και με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (MAb 2) σημασμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP). Μετά από μια περίοδο επώασης που επιτρέπει το σχηματισμό ενός σάντουιτς: επιστρωμένο MAb 1 – ανθρώπινη ρενίνη – MAb 2 – HRP, η πλάκα μικροτιτλοδότησης υποβάλλεται σε πλύση για να απομακρυνθεί το σημασμένο με ένζυμο αδέσμευτο αντίσωμα. Το σημασμένο με ένζυμο δεσμευμένο αντίσωμα μετράται μέσω μιας χρωμογόνου αντίδρασης. Προστίθεται και επωάζεται χρωμογόνο διάλυμα (TMB). Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη ανασχετικού διαλύματος και στη συνέχεια γίνεται ανάγνωση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο κατάλληλο μήκος κύματος. Η ποσότητα μετατροπής του υποστρώματος καθορίζεται χρωματομετρικά μετρώντας την απορρόφηση, η οποία είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση ανθρώπινης ρενίνης. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ρενίνης στα δείγματα με αναγωγή από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
 Πλάκα μικροτιτλοδότησης με 96 αποσώψωμενες υποδοχές επιστρωμένες με αντι-ρενίνη (μονοκλωνικά αντισώματα)	96 υποδοχές	μπλε	Έτοιμο για χρήση
Ab HRP CONC Σύζευγμα: αντι-ρενίνη (μονοκλωνικά αντισώματα) σημασμένα με HRP σε ρυθμιστικό διάλυμα TRIS με λευκοματίνη βόειου ορού και θυμόλη	1 φιαλίδιο 0,05 ml	κίτρινο	Αραιώστε με ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος (βλ. ετικέτα για τον ακριβή συντελεστή αραιώσης)
CONJ BUF Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος: ρυθμιστικό διάλυμα TRIS με βόεια ορολευκοματίνη και θυμόλη	1 φιαλίδιο 10,5 ml	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
CAL N Βαθμονομητής N = 0 έως 5, σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη . Δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων.	6 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού
CONTROL N Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	ασημί	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (Tris-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CHROM TMB Χρωμογόνος TMB (τετραμεθυλβενζιδίνη)	1 φιαλίδιο 12 ml	καφέ	Έτοιμο για χρήση
STOP SOLN Ανασχετικό αντιδραστήριο: HCl 1,0 N	1 φιαλίδιο 12 ml	λευκό	Έτοιμο για χρήση

Σημείωση: 1. Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.
2. 1 pg του παρασκευάσματος βαθμονομητή αντιστοιχεί σε 2,2 +/- 0,2 mIU του NIBSC 68/356.
Οι τιμές που λαμβάνονται σε pg/ml πρέπει να πολλαπλασιάζονται επί 2,2 για τη λήψη αποτελεσμάτων σε mIU/ml ή mIU/l.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας
- Πιπέτες για διανομή: 25 μl, 100 μl, 200 μl και 1 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Πλαστικά σωληνάρια για την αραιώση δειγμάτων
- Αναμεικτης στροβίλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Οριζόντιος αναδευτήρας πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα περιστροφής 400 σ.α.λ. ± 100 σ.α.λ.
- Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης
- Αναγνώστης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm, 490 nm και 650 nm (στην περίπτωση πολυχρωματικής ανάγνωσης) ή με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm και 650 nm (μονοχρωματική ανάγνωση)
- Προαιρετικός εξοπλισμός: Το ELISA-AID™ που απαιτείται για την ανάγνωση της πλάκας σύμφωνα με την πολυχρωματική ανάγνωση (βλ. παράγραφο XIA.) πωλείται από την Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 Η.Π.Α..

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 2ml απεσταγμένου νερού.
! Για πλήρη διαλυτοποίηση: μετά την ανασύσταση, αφήστε τα φιαλίδια για 30 min σε αναδευτήρα, και κατόπιν αναμειξτε τα σε αναμεικτή στροβίλισμού (vortex).
- B. Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 2 ml απεσταγμένου νερού.
- C. Σύζευγμα εργασίας ρενίνης - HRP:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος συζεύγματος, αραιώνοντας το συμπυκνωμένο σύζευγμα Ρενίνης-HRP με ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος. Βλ. ετικέτα για τον ακριβή συντελεστή αραιώσης. Χρησιμοποιήστε αναμεικτή στροβίλισμού (τύπου vortex) για να ομογενοποιήσετε. Προτείνεται προετοιμασία τη στιγμή της χρήσης.
- D. Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 199 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (200x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου είναι ασταθείς. Χρησιμοποιήστε τους αμέσως μετά την ανασύσταση, καταψύξτε τους αμέσως σε κλάσματα και διατηρήστε τους στους –20°C για έως και 6 εβδομάδες. Παραμένουν σταθεροί μετά από 1 κύκλο κατάψυξης-απόψυξης.
- Αποφεύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα πρέπει να είναι πλάσμα με EDTA.
- Εάν η δοκιμασία δεν εκτελεστεί εντός 4 ωρών, το πλάσμα θα πρέπει να χωριστεί σε κλάσματα και να φυλαχθεί στους –20°C.
- Αποφεύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.
- Μην χρησιμοποιείτε δείγματα που έχουν υποστεί αιμόλυση.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμειξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Εκτελέστε εις διπλούν ανάληψη των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου και των δειγμάτων. Συνιστάται κάθετη ευθυγράμμιση. Χρησιμοποιήστε ένα καθαρό, πλαστικό δοχείο για να ετοιμάσετε το διάλυμα πλύσης. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση.

Αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη για τη διανομή του Χρωμογόνου Διαλύματος και του Ανασχετικού Διαλύματος.
Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες.
Τηρείτε τους χρόνους επώασης.
Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.
Διανείμετε το Χρωμογόνο Διάλυμα εντός 15 λεπτών από την πλύση της πλάκας μικροτιτλοδότησης.
Κατά τη διάρκεια επώασης με το Χρωμογόνο Διάλυμα, αποφύγετε την έκθεση της πλάκας μικροτιτλοδότησης σε άμεσο ηλιακό φως.

B. Διαδικασία

- 1. Επιλέξτε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών για την ανάλυση. Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες πρέπει να ξανασφραγιστούν μέσα στη σακούλα με τον αποξηραντικό παράγοντα και να φυλαχτούν σε θερμοκρασία 2-8°C.
- 2. Ασφαλίστε τις ταινίες μέσα στο πλαίσιο στήριξης.
- 3. Διανείμετε 200 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατάλληλες υποδοχές.
- 4. Επωάστε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντιο αναδευτήρα, ρυθμισμένο στις 400 σ.α.λ. ± 100 σ.α.λ..
- 5. Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
- 6. Πλύνετε την πλάκα 3 φορές.
- 7. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ρενίνη-HRP συζεύγματος εργασίας σε όλες τις υποδοχές.
- 8. Επωάστε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντιο αναδευτήρα ρυθμισμένο στις 400 σ.α.λ. ± 100 σ.α.λ..
- 9. Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
- 10. Πλύνετε την πλάκα 3 φορές.
- 11. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl του χρωμογόνου διαλύματος σε κάθε υποδοχή, εντός 15 λεπτών από το βήμα πλύσης.
- 12. Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, αποφύγετε την άμεση έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.
- 13. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε υποδοχή.
- 14. Κάντε ανάγνωση των απορροφήσεων στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς 630 nm ή 650 nm) εντός 1 ώρας και υπολογίστε τα αποτελέσματα όπως περιγράφεται στην ενότητα XI.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- 1. Κάντε ανάγνωση της πλάκας στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
- 2. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- 3. Σε ημιλογαριθμικό ή γραμμικό χαρτί γραφημάτων, παραστήστε γραφικά τις τιμές OD (τεταγμένη) για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης της ρενίνης (τετμημένη) και σχεδιάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης μέσω των σημείων του βαθμονομητή, συνδέοντας με ευθείες γραμμές τα αποτυπωμένα σημεία.
- 4. Διαβάστε τη συγκέντρωση για κάθε ορό ελέγχου και δείγμα με αναγωγή στην καμπύλη βαθμονόμησης.
- 5. Αναγωγή δεδομένων με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή θα απλοποιήσει αυτούς τους υπολογισμούς. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

Renin-EASIA		Μονάδες OD
Βαθμονομητής	0 pg/ml	0,074
	3,9 pg/ml	0,121
	11 pg/ml	0,2
	55 pg/ml	0,68
	91 pg/ml	1,068
	270 pg/ml	2,6

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν εικοσιτέσσερις μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων πάνω από τις μέσες μετρήσεις OD σε μηδενική δέσμευση, ήταν 0,8 pg/ml.

B. Ειδικότητα

Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα της προ-ρενίνης σε αυτόν τον EASIA προσδιορισμό ρενίνης προσδιορίστηκε μέσω προσθήκης προ-ρενίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις σε μία μήτρα πλάσματος και μετρώντας την εμφανή απόκριση της ρενίνης. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα της ρενίνης βρέθηκε να είναι 0,2%.

C. Παρεμβολές αιμοσφαιρίνης και χολερυθρίνης

Στο kit Diasource Renin EASIA εξετάστηκε η αιμοσφαιρίνη σε συγκέντρωση 7,5 mg/ml και η χολερυθρίνη σε συγκέντρωση 0,2 mg/ml. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα.
Δεν φάνηκε σημαντική παρεμβολή από τη χολερυθρίνη, τα αιμολυμένα δείγματα θα πρέπει ωστόσο να αποφεύγονται.

Δείγμα	Τιμή ρενίνης (pg/ml)	Τιμή ρενίνης + αιμοσφαιρίνη (pg/ml)	Τιμή ρενίνης + χολερυθρίνη (pg/ml)
Πλάσμα 1	12,8	7,5	13,1
Πλάσμα 2	62,7	41,0	60,0
Πλάσμα 3	10,8	7,1	11,7

D. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Δείγμα	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)	Δείγμα	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)
A	22	16,7 ± 0,9	5,4	A	10	16,8 ± 1,1	6,2
B	24	67,3 ± 1,5	2,2	B	10	64,6 ± 2,2	3,3

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

E. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ			
Δείγμα	Προστεθείσα ρενίνη (pg/ml)	Ανακτηθείσα ρενίνη (pg/ml)	Ανάκτηση (%)
Ορός	37,1	38,0	102,4
	78,0	62,0	79,5
	131,2	109,1	83,2
	228,5	241,5	105,7

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ			
Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (pg/ml)
1	1/1	-	103,8
	1/2	53,6	51,9
	1/4	24,2	25,9
	1/8	11,1	12,9
2	1/1	-	105,8
	1/2	52,9	51,6
	1/4	26,4	26,6
	1/8	13,2	13,8
	1/16	6,6	5,5

Το δείγμα αραιώθηκε με το μηδενικό βαθμονομητή.

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατενυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης. Οροί ελέγχου που περιέχουν αζίδιο θα επιδράσουν στην ενζυμική αντίδραση και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.
- Συνιστάται οι οροί ελέγχου να υποβάλλονται σε προσδιορισμό τακτικά ως άγνωστα δείγματα για να μετράται η μεταβλητότητα του προσδιορισμού. Η απόδοση του προσδιορισμού πρέπει να παρακολουθείται με διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου των ορών ελέγχου.
- Είναι καλό το να ελέγχετε οπτικά την προσαρμογή της καμπύλης που επιλέχθηκε από τον υπολογιστή.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Το φυσιολογικό εύρος καθορίστηκε σε πλάσμα EDTA 60 εμφανώς υγιών, νήστεων υποκειμένων, ηλικίας 20 έως 60 ετών: 40 άνδρες και 20 γυναίκες, χωρίς θεραπεία οιστρογόνων-προγεστερόνης και χωρίς θεραπεία υπέρτασης. Για κάθε υποκείμενο λήφθηκαν δύο δείγματα αίματος: ένα μετά από 1 ώρα δραστηριότητας σε όρθια θέση και άλλο ένα μετά από παραμονή σε ύπτια θέση για μία ώρα.

Τα όρια ευρών είναι σταθεροποιημένα μεταξύ 5^{ου} και 95^{ου} εκατοστημόριου

Όρθια θέση	0,1 – 25,5 pg /ml
Ύπτια θέση	0,1 – 9,7 pg /ml

Χρειάζεται προσοχή, διότι υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα ρενίνης (ηλικία, στάση, θεραπεία με οιστρογόνα, αντιπερτασική αγωγή...).

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφαλείας
Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.
Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.
Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.
Αποφύγετε κάθε επαφή με το δέρμα με όλα τα αντιδραστήρια, το ανασχτικό διάλυμα περιέχει HCl. Σε περίπτωση επαφής, πλύνετε σχολαστικά με νερό.
Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

(1) Primary structure of the human Renin gene : Hardman J.A; and al. ; DNA (1984): 3(6):457-468.
(2) Control of glomerular filtration rate by rennin-angiotensin system : Hall J. E. and al; Am.J.Physiol. (1977) : 233(5) :F366-F372
(3) Raised aldosterone to renine ratio predicts antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study : Lim P.O. and al ; Br. J. Clin. Pharmacol. (1999) : 48(5) :756-760 .
(4) Screening of primary aldosteronism :Schirpenbach C. and al ; Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.(2006) : 20(3) : 369-384 .
(5) Diagnostic procedure in renovascular hypertension :Distler A. and al. Clinical nephrology (1991) :36(4):174-180
(6) Circulating and tissue angiotensin systems :Campbell D.J. ; J. Clin . Invest. (1987) :79(1) :1-6

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗ- ΤΕΣ (μl)	ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) (μl)
Βαθμονομητές (0-5) Οροί ελέγχου, Αραιωμένα	200 -	- 200
Επωάστε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με διαρκή ανάδευση στις 400 σ.α.λ.. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 μl διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
Σύζευγμα αντι-ρενίνης	100	100
Επωάστε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με διαρκή ανάδευση στις 400 σ.α.λ.. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής. Πλύνετε 3 φορές με 400 μl διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.		
Αποκαλυπτικό διάλυμα	100	100
Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου		
Ανασχτικό διάλυμα	100	100
Κάντε ανάγνωση σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης. Καταγράψτε την απορρόφηση κάθε υποδοχής στα 450 nm (έναντι 630 ή 650 nm)		

Αρ. Καταλόγου DIASource: KAP1531	Αριθμός P.I.: 1700482/el	Αρ. αναθεώρησης: 131029/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

ημερομηνία αναθεώρησης : 2013-10-29



pl

Przed użyciem zestawu należy przeczytać dokładnie niniejszą instrukcję

RENIN-EASIA

I. PRZEZNACZENIE

Test immunoenzymometryczny (IEMA) do ilościowego oznaczania *in vitro* aktywnej reniny w ludzkim osoczu.

II. INFORMACJE OGÓLNE

A. Nazwa handlowa:	DIAsource Renin-EASIA Kit
B. Numer katalogowy:	KAP1531: 96 testów
C. Producent:	DIAsource ImmunoAssays S.A. Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia

Pomoc techniczna i informacja o zamówieniach dostępna jest pod poniższymi numerami:
tel : +32 (0)10 84.99.11 faks: +32 (0)10 84.99.91

III. PODSTAWY KLINICZNE

Renina, enzym polipeptydowy (masa cząsteczkowa ~ 40000)^[1], znany również jako angiotensynogenaza, jest krążącą proteazą wydzielaną przez komórki przykłębuszkowe aparatu przykłębuszkowego nerki w odpowiedzi na niską objętości krwi lub obniżony poziom NaCl w organizmie.

Renina aktywuje układ renina-angiotensyna poprzez rozszczepianie angiotensynogenu produkowanego w wątrobie w angiotensynę I (nieaktywną), który jest następnie przekształcany w angiotensynę II (aktywną) w nabłonku naczyniowym płuc. Angiotensyna II może powodować zwężenie naczyń poprzez stymulowanie ośrodkowego układu nerwowego. Ponadto stymuluje wydzielanie hormonu antydiuretycznego (ADH) oraz wydzielanie aldosteronu z nadnercza^[6].

Najważniejszymi funkcjami układu renina-angiotensyna jest regulacja ciśnienia krwi oraz kontrola filtracji kłębuszkowej nerek^[2].

Stężenie reniny w surowicy jest zależne od stężenia krążącego angiotensynogenu, a co za tym idzie od stężenia angiotensyny II. Wysoki poziom angiotensyny II w osoczu zmniejsza wydzielanie reniny (ujemne sprzężenie zwrotne).

Określenie poziomu reniny w osoczu jest użyteczne w diagnostyce nadciśnienia i terapeutycznych obserwacji chorych z nadciśnieniem^[3].

Stężenie reniny w osoczu zmniejsza się u pacjentów z nadciśnieniem powodu hiperaldosteronizmu pierwotnego^[4], w odróżnieniu od nadciśnienia nerkowego^[5], w przypadku którego podwyższone są stężenia zarówno aldosteronu jak i reniny.

IV. ZASADA METODY

Test DIAsource Renin-EASIA (*Enzyme Amplified Sensitivity ImmunoAssay*) jest testem immunoenzymatycznym fazy stałej o wzmacnionej czułości, przeprowadzanym na płytkach do mikromiareczkowania. Surowica kalibracyjna i próbki reaguje ze związanym przeciwciałem monoklonalnym (MAb 1), którym powleczone jest płytka do mikromiareczkowania, a także z przeciwciałem monoklonalnym (MAb 2) oznakowanym peroksydazą chrzanową (HRP). Po okresie inkubacji umożliwiającej powstawanie "kanapki": powłoka MAb 1 - ludzka renina - MAb 2 - HRP, płytka do mikromiareczkowania jest przepłukiwana w celu usunięcia niezwiązanego znakowanego enzymu przeciwciała. Związane przeciwciała znakowane enzymem są analizowane przy zastosowaniu reakcji chromogenicznej. Po dodaniu roztworu chromogennego (TMB) następuje inkubacja. Reakcja jest zatrzymywana przez dodanie roztworu hamującego, a następnie płytkę odczytuje się na odpowiedniej długości fali. Ilość substratu uległego przemianom określa się kolorymetrycznie poprzez pomiar absorbancji, która jest proporcjonalna do stężenia ludzkiej reniny. Wykreśla się krzywą wzorcową, a stężenie reniny w próbkach oznacza się przez interpolację z tej krzywej.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZANE W ZESTAWIE

odczynnik	zestaw 96 testów	oznaczenie kodowe (kolor)	sposób rekonstrukcji
 Płytki do mikromiareczkowania z 96 dołkami pokrytymi antyreninowymi przeciwciałami monoklonalnymi.	96-dołkowa płytka	niebieski	gotowa do użycia
Ab HRP CONC Koniugat: antyrenina (przeciwciała monoklonalne) znakowane HRP w buforze TRIS z albuminą surowicy bydlęcej oraz tymolem.	1 fiołka 0,05 ml	czerwony	rozcieńczyć zbuforowanym roztworem koniugatu (dokładny współczynnik rozcieńczenia znajduje się na etykiecie)
CONJ BUF Bufor koniugatu: bufor TRIS z albuminą surowicy bydlęcej oraz tymolem.	1 fiołka 10,5 ml	czerwony	gotowy do użycia
CAL N Surowica kalibracyjna o N od 0 do 5, w surowicy ludzkiej oraz tymolu. Dokładne wartości zostały oznaczone na etykietach fiolek.	6 fiolek, liofilizat	żółty	dodać 2 ml wody destylowanej
CONTROL N Surowica kontrolna – N=2, w surowicy ludzkiej z tymolem.	2 fiołki, liofilizat	srebrny	dodać 2 ml wody destylowanej
WASH SOLN TMB Roztwór do przepłukiwania (TRIS z HCl).	1 fiołka 10 ml	brązowy	rozcieńczyć 200-krotnie za pomocą wody destylowanej (zastosować mieszadło magnetyczne)

odczynnik	zestaw 96 testów	oznaczenie kodowe (kolor)	sposób rekonstrukcji		
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Chromogeniczny roztwór TMB (tetrametylobenzydyny).	CHROM	TMB	1 fiołka 12 ml	biały	gotowy do użycia
CHROM	TMB				
<table><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Roztwór zatrzymujący: 1,0 N HCl	STOP	SOLN	1 fiołka 12 ml	czarny	gotowy do użycia
STOP	SOLN				

Uwagi:

1. Do rozcieńczenia próbki należy użyć surowicy kalibracyjnej "0".
2. 1 pg przygotowanej surowicy kalibracyjnej odpowiada 0,2 µIU NIBSC 68/356.

Aby uzyskać wynik w µIU/ml lub mIU/l, wartości uzyskane w pg/ml należy pomnożyć przez 2,2.

VI. MATERIAŁY NIE DOSTARCZANE W ZESTAWIE

Następujące materiały, potrzebne do przeprowadzenia badania, nie są przez nas dostarczane w zestawie:

1. Woda destylowana wysokiej jakości.
2. Mikropipety kalibrowane o pojemnościach: 25 µl, 100 µl, 200 µl oraz 1 ml (zaleca się stosowanie pipet o wymienionych pojemnościach z wymienną, plastikową końcówką).
3. Plastikowe próbki do rozcieńczania próbek.
4. Wytrząsarka vortex.
5. Mieszadło magnetyczne.
6. Wytrząsarka płaska do płytek o prędkości 400 ±100 obr./min.
7. Płuczka do płytek.
8. Czytnik płytek o możliwości odczytywania fal o długości 450 nm, 490 nm oraz 650 nm (w przypadku odczytów polichromatycznych) bądź 450 nm i 650 nm (w przypadku odczytów monochromatycznych).
9. Wyposażenie opcjonalne: ELISA-AID™, niezbędne do odczytania płytki zgodnie z odczytem polichromatycznym (patrz punkt X.I.A.). Można je zakupić od: Robert Maciels Associates, Inc. Mass. 0.2174 USA.

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

A. Surowice kalibracyjne. Surowice kalibracyjne należy odtworzyć poprzez dodanie do nich 2 ml wody destylowanej.

Uwaga! W celu całkowitego rozpuszczenia zawartości, po dodaniu wody destylowanej należy umieścić je na 30 min. na wytrząsarce płaskiej, a następnie w wytrząsarce vortex.

B. Próbkę surowicy kontrolnej: Próbkę surowicy kontrolnej należy odtworzyć poprzez dodanie do nich 2 ml wody destylowanej.

C. Koniugat roboczy renina-HRP: Przygotować odpowiednią objętość roztworu koniugatu poprzez rozcieńczenie koncentratu koniugatu renina-HRP buforem koniugatu. Dokładny współczynnik rozcieńczenia znajduje się na etykiecie. W celu homogenizacji roztworu należy użyć wytrząsarki vortex. Zaleca się przygotowanie roztworu bezpośredniego przed użyciem.

D. Roboczy roztwór do przepłukiwania: Przygotować odpowiednią objętość roztworu do przepłukiwania poprzez dodanie 199 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu do przepłukiwania (200x). Do homogenizacji należy użyć mieszadła magnetycznego. Niewykorzystany roboczy roztwór do przepłukiwania należy pod koniec dnia wylać.

VIII. PRZECHOWYWANIE I TERMIN PRZYDATNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją, wszystkie elementy zestawu są stabilne do daty ważności podanej na etykiecie, jeśli były przechowywane w temperaturze od 2 do 8 °C.
- Po rozpuszczeniu, roztwory surowicy kalibracyjnej i kontrolnej są niestabilne, należy je użyć natychmiast po rozpuszczeniu, bezzwłocznie zamrozić w podzielonych porcjach i przechowywać w temperaturze -20 °C przez maksymalnie 6 tygodni. Są stabilne po 1 cyklu zamrażania-rozmrażania.
- Należy unikać kolejnych cykli zamrażania-rozmrażania.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór do płukania płytek powinien być zużyty w tym samym dniu.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników zestawu mogą wskazywać na ich niestabilność lub obniżenie jakości.

IX. ZEBRANIE I PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

- Próbkę osocza muszą być pobierane na EDTA.
- Jeżeli badania nie przeprowadza się w czasie do 4 godzin po pobraniu, surowice należy podzielić i przechowywać w -20 °C.
- Należy unikać kolejnych cykli zamrażania-rozmrażania.
- Nie należy używać próbek, które uległy hemolizie.

X. SPOSÓB WYKONANIA BADANIA

A. Uwagi ogólne

Nie należy korzystać z zestawu lub jego składników po upływie daty ważności.

Nie wolno mieszać materiałów z różnych zestawów.

Przed użyciem doprowadzić wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej.

Dokładnie wymieszać wszystkie odczynniki i próbki przez delikatne ich poruszanie lub wirowanie.

Należy wykonać podwójne porcje roztworów surowicy kalibracyjnej, surowicy kontrolnej oraz próbek. Zaleca się ich równoległe porównywanie.

Do przygotowania roztworu płuczącego należy użyć czystego, plastikowego pojemnika.

W celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy stosować czyste, jednorazowe końcówki pipet.

Do dodawania roztworu chromogennego i roztworu zatrzymującego nie należy używać pipet z elementami metalowymi.

Stosowanie pipet precyzyjnych lub automatycznych poprawia precyzję badania.

Należy przestrzegać podanego czasu inkubacji.

Krzywą kalibracji należy przygotować osobno dla każdego badania, nie należy używać danych z poprzednich badań.

Roztwór chromogeny należy użyć w ciągu 15 minut od przemycia płytki do mikromiarczowania.

Podczas inkubacji z roztworem chromogenicznym, unikać bezpośredniego padania światła słonecznego na mikropłytkę.

B. Procedura przeprowadzenia badania

1. Do badania należy wybrać potrzebną liczbę dołków. Niewykorzystane dołki należy zamknąć w torebce ze środkiem suszącym i przechowywać w temperaturze 2-8 °C.
2. Zamontować dołki w ramce.
3. Nalać za pomocą pipety po 200 µl każdej z surowic: kalibracyjnej, kontrolnej i próbki do odpowiednich studzienek.
4. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na poziomej wstrząsarce o prędkości 400 ± 100 obrotów na minutę.
5. Odessać płyn z każdego dołka.
6. Przepłukać płytkę 3 razy.

7. Nalać za pomocą pipety po 100 µl koniugatu roboczego renina-HRP do wszystkich dołków.
8. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na poziomej wstrząsarce ustawionej na 400 ± 100 obrotów na minutę.
9. Odessać płyn z każdego dołka.
10. Przepłukać płytkę 3 razy.
11. Nalać za pomocą pipety po 100 µl chromogenicznego roztworu do każdej studzienki w czasie nie dłuższym niż 15 minut po etapie przepłukiwania.
12. Inkubować płytki do mikromiarczowania przez 30 minut w temperaturze pokojowej, unikając bezpośredniego nasłonecznienia płytek.
13. Nalać za pomocą pipety po 100 µl roztworu zatrzymującego do każdego dołka.
14. Wykonać odczyt przy długości fali 450 nm (filtr referencyjny: 630 nm lub 650 nm) w ciągu 1 godziny, a następnie obliczyć wyniki zgodnie z opisem w części XI.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1. Odczytać płytkę przy długości fali 450 nm z filtrem referencyjnym ustawionym na 650 nm (lub 630 nm).
2. Obliczyć średnią z dwóch oznaczeń.
3. Na półlogarytmicznym lub liniowym papierze milimetrowym oznaczyć wartości OD (oś rzędnych) dla każdej surowicy kalibracyjnej wobec odpowiedniego stężenia ludzkiej reniny (oś odciętych) i wykreślić krzywą wzorcową przechodzącą przez punkty kalibracyjne, łącząc je na wykresie prostoliniowymi odcinkami.
4. Stężenia dla każdej surowicy kontrolnej i każdej próbki odczytać przez interpolację krzywej wzorcowej.
5. Obróbka danych przy użyciu komputera uprości te obliczenia. W przypadku automatycznego przetwarzania wyników zaleca się wykorzystanie krzywej funkcji logistycznej czteroparametrowej.

XII. TYPOWE DANE

Zamieszczone poniżej dane są jedynie danymi przykładowymi i w żadnym wypadku nie powinny być użyte zamiast rzeczywistej krzywej wzorcowej.

renina ludzka - EASIA			jednostki OD
surowica kalibracyjna	0	pg/ml	0,074
	3,9	pg/ml	0,121
	11	pg/ml	0,2
	55	pg/ml	0,68
	91	pg/ml	1,068
	270	pg/ml	2,6

XIII. WYDAJNOŚĆ I OGRANICZENIA TESTU

A. Próg wykrywalności

Badano 24 surowice kalibracyjne "0" wraz z zestawem innych wzorców. Próg wykrywalności, określony jako pozorne stężenie dwóch odchylen standardowych powyżej średniej OD przy zerowym wiązaniu wynosił 0,8 pg/ml.

B. Specyficzność

Reaktywność krzyżowa proreniny w tym teście Renin-EASIA została określona poprzez dodawanie różnych stężeń proreniny do matrycy z surowicą, a następnie pomiar wyraźnej reakcji reniny. Reaktywność krzyżowa proreniny wynosi 0,2%.

C. Interferencje z hemoglobina i bilirubina

Zestaw DAsource Renin-EASIA Kit był testowany w obecności hemoglobiny przy stężeniu 7,5 mg/ml i bilirubiny w stężeniu 0,2 mg/ml. Wyniki przedstawiono w poniższej tabeli. Nie stwierdzono znaczących interferencji z bilirubina, ale należy unikać próbek, które uległy hemolizie.

próbka	wartość dla reniny (pg/ml)	wartość dla reniny + hemoglobina (pg/ml)	wartość dla reniny + bilirubina (pg/ml)
surowica 1	12,8	7,5	13,1
surowica 2	62,7	41,0	60,0
surowica 3	10,8	7,1	11,7

D. Precyzja

W OBRĘBIE BADANIA				POMIĘDZY BADANIAM			
próbka	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	próbka	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	22	16.7 ± 0.9	5.4	A	10	16.8 ± 1.1	6.2
B	24	67.3 ± 1.5	2.2	B	10	64.6 ± 2.2	3.3

SD – odchylenie standardowe

CV – współczynnik zmienności

E. Dokładność

BADANIE ODZYSKU

próbka	dodana renina (pg/ml)	odzyskana renina (pg/ml)	odzysk (%)
osocze	37.1	38.0	102.4
	78.0	62.0	79.5
	131.2	109.1	83.2
	228.5	241.5	105.7

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

próbka	rozcieńczenie	stężenie teoretyczne (pg/ml)	stężenie zmierzone (pg/ml)
1	1/1	-	103.8
	1/2	53.6	51.9
	1/4	24.2	25.9
	1/8	11.1	12.9
2	1/1	-	105.8
	1/2	52.9	51.6
	1/4	26.4	26.6
	1/8	13.2	13.8
	1/16	6.6	5.5

próbki rozcieńczano surowicą kalibracyjną "0"

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla Próbkki kontrolnej 1 i/lub Próbkki kontrolnej 2, nie mieszczą się w zakresie podanym na etykiecie fiołki, wartości te nie mogą być stosowane, chyba że uzyskano zadowalające wyjaśnienie rozbieżności.
- Jeśli pożądane, każde laboratorium może przygotować swoje własne próbki kontrolne, które powinny być przechowywane zamrożone w porcjach. Próbkki kontrolne zawierające azydek interferują z reakcją enzymatyczną i nie mogą być użyte.
- Kryteria akceptacji dla różnicy pomiędzy wynikami duplikatów próbek powinny polegać na Dobrej Praktyce Laboratoryjnej.
- Zaleca się, aby próbki kontrolne były rutynowo oznaczane jako nieznane próbki do pomiaru zmienności testu. Wykonanie badania powinno być porównywane z wykresami kontroli jakości próbek kontrolnych.
- Dobrą praktyką jest, aby sprawdzić wizualnie dopasowanie krzywej wygenerowanej przez komputer.

XV. PRZEDZIAŁY REFERENCYJNE

Zakres normalny został określony na surowicy z EDTA pobranej od 60 pozornie zdrowych osób, na czczo, w wieku od 20 do 60 lat. 40 mężczyzn i 20 kobiet, nie leczonych estrogenami ani progesteronem i nie leczonych na nadciśnienie tętnicze. Od każdego pacjenta pobrano dwie próbki krwi: jedną po 1 godzinie aktywności w pozycji pionowej, a drugą po pozostawianiu w pozycji leżącej przez godzinę. Granice zakresu ustalono pomiędzy 5 a 95 percentylem.

pozycja pionowa 0,1-25,5 pg/ml
pozycja leżąca 0,1-9,7 pg/ml

Każde laboratorium powinno ustalić własny normalny zakres wartości.

Należy zachować ostrożność, gdyż na poziom reniny ma wpływ wiele czynników, takich jak wiek pacjenta, budowa ciała, leczenie estrogenami czy przyjmowanie leków na nadciśnienie oraz inne.

XVI. OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Bezpieczeństwo

Wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.

Składniki tego zestawu zawierające ludzką krew zostały przebadane przy zastosowaniu metod zatwierdzonych przez Europę oraz FDA i stwierdzono w nich wynik ujemny dla HBsAg, anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod analitycznych nie daje całkowitej pewności, że substancje pochodne krwi ludzkiej nie przekazują zapalenia wątroby, AIDS i innych zakażeń. Dlatego posługiwanie się odczynnikami lub próbkami surowicy powinny być zgodne z obowiązującymi procedurami bezpieczeństwa.

Wszystkie produkty odzwierzęce i ich pochodne zostały pobrane od zwierząt zdrowych. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie notowano przypadków BSE. Niemniej jednak, składniki zawierające substancje odzwierzęce powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu wszystkich odczynników ze skórą. Roztwór hamujący zawiera H₂SO₄. W przypadku kontaktu, przemyć skórę dokładnie wodą.

Nie palić, nie pić, nie jeść i nie stosować kosmetyków w obszarze roboczym. Nie nabierać roztworów pipetą za pomocą ust. Stosować odzież ochronną i rękawice jednorazowe.

XVII. BIBLIOGRAFIA

[1] Primary structure of the human Renin gene: Hardman J.A; and al. [w:] DNA (1984) nr 3(6) str.457-468.

[2] Control of glomerular filtration rate by rennin-angiotensin system: Hall J. E. i in.; [w:]Am.J.Physiol. (1977) nr 233(5) str. F366-F372

[3] Raised aldosterone to renine ratio predicts antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study:

Lim P.O. i in. [w:] Br. J. Clin. Pharmacol. (1999) nr 48(5) str. 756-760.

[4] Screening of primary aldosteronism: Schirpenbach C. i in. [w:] Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab (2006) nr 20(3) str. 369-384

[5] Diagnostic procedure in renovascular hypertension: Distler A. i in. [w:] Clinical nephrology (1991) nr 36(4) str.174-180

[6] Circulating and tissue angiotensin systems: Campbell D.J. [w:] J. Clin. Invest. (1987) nr 79(1) str. 1-6

XVIII. PODSUMOWANIE

	próbki kalibracyjne (µl)	próbki oraz próbki kontrolne (µl)
próbki kalibracyjne (0-6) próbki kontrolne	200 -	- 200
Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z ciągłym wytrząsaniem przy 400 obr./min. Odessać zawartość każdego dołka. Przemyć 3 razy po 400 µl roztworu płuczającego i odessać.		
koniugat antyrenina	100	100
Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z ciągłym wytrząsaniem przy 400 obr./min. Odessać zawartość każdego dołka. Przemyć 3 razy po 400 µl roztworu płuczającego i odessać.		
roztwór chromogeniczny	100	100
Inkubować przez 30 minut w temperaturze pokojowej.		
roztwór hamujący	100	100
Odczytuje się na czytniku płytek do mikromiareczkowania. Odczytywać absorbancję każdego dołka przy długości fali 450 nm (wobec 630 lub 650 nm).		

nr katalogowy DIAsource: KAP1531	numer P.I.: 1700482/en	nr wersji: 131029/1
--	---------------------------	------------------------

Data wniesienia poprawek: 13-10-29.