



Instructions for Use

Angiotensin I RIA

IVD



REF RIA-5309

 **100 tubes**



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis

1	PRINCIPLE	2
2	WARNING AND PRECAUTIONS.....	2
3	SPECIMEN COLLECTION, PROCESSING, STORAGE AND DILUTION	3
4	MATERIALS PROVIDED	4
5	MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED.....	4
6	RESULTS.....	5
7	EXPECTED VALUES.....	5
8	QUALITY CONTROL	5
9	PROCEDURE	6
10	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	7
11	LIMITATIONS.....	7
1	PRINZIP	8
2	WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN	8
3	PROBENENTNAHME, -BEHANDLUNG, -LAGERUNG UND VERDÜNNUNG.....	9
4	MITGELIEFERTE MATERIALIEN	10
5	ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN.....	10
6	ERGEBNISSE	11
7	ERWARTETE WERTE.....	11
8	QUALITÄTSKONTROLLE.....	11
9	DURCHFÜHRUNG	12
10	SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE	13
11	EINSCHRÄNKUNGEN.....	13
12	APPENDIX - PERFORMANCE CHARACTERISTICS	14
	SYMBOLS USED.....	16

RADIOIMMUNOASSAY OF ANGIOTENSIN I FOR THE IN VITRO DETERMINATION OF PLASMA RENIN ACTIVITY (PRA) IN HUMAN PLASMA**For *in vitro* diagnostic use.****1 PRINCIPLE**

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

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

The immunoassay of angiotensin I is a radioimmunological competition assay. Unknown samples, control, and calibrators are incubated in polyclonal antibody-coated tubes with ¹²⁵I-labeled angiotensin I as tracer. After incubation, the contents of the tubes are aspirated. The bound radioactivity is then determined in a gamma counter. A standard curve is established and unknown values are determined by interpolation from the standard curve.

2 WARNING AND PRECAUTIONS**2.1 General remarks**

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

2.2 Basic rules of radiation safety

The purchase, possessing, utilization, and transfer of radioactive material are subject to the regulations of the country of use. Adherence to the basic rules of radiation safety should provide adequate protection:

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

2.3 Sodium azide

Some reagents contain sodium azide as a preservative. Sodium azide may react with lead, copper or brass to form explosive metal azides. Dispose of the reagents by flushing with large amounts of water through the plumbing system.

2.4 Materials of human origin

All plasma samples should be handled as if capable of transmitting hepatitis or AIDS and waste should be discarded according to the country rules.

2.5 GHS Hazard Classification**Angiotensin Tracer**

WARNING 

H317 May cause an allergic skin reaction.

P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.

P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 Take off contaminated clothing and wash it before use.

reaction mass of:

5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 247-500-7] and 2-methyl-4-isothiazolin-3-one [EC# 220-239-6](3:1) <0.05%

Inhibitor

DANGER  

H317 May cause an allergic skin reaction.

H360 May damage fertility or the unborn child.

P201 Obtain special instructions before use.

P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.

P308+P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.

P333+P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 Take off contaminated clothing and wash it before use.

8-Hydroxyquinoline 0.1 - 0.2%

Wash Solution (20X)

DANGER 

H360 May damage fertility or the unborn child.

P201 Obtain special instructions before use.

P280 Wear protective gloves, protective clothing and eye/face protection.

P308+P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.

Boric Acid 0.1 - 0.3%

Sodium Borate Decahydrate 0.1 - 0.3%

The Safety Data Sheet (SDS) is available upon request.

3 SPECIMEN COLLECTION, PROCESSING, STORAGE AND DILUTION

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

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

4 MATERIALS PROVIDED

All reagents of the kit are stable until the expiry date indicated on the kit label, if stored at 2 °C - 8 °C.

Storage conditions for reagents after reconstitution or dilution are indicated in paragraph Procedure.

Expiry dates printed on component vial labels apply to the long-term storage by manufacturer only, prior to assembling of the kit. Do not take into account.

Anti-angiotensin I polyclonal antibody-coated tubes: 2 x 50 tubes

(ready-to-use)

¹²⁵I-labeled angiotensin I: one 11 mL vial (ready-to-use)

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

Calibrators: six 1 mL vials (ready-to-use)

The calibrator vials contain from 0 to approximately 30 ng/mL of angiotensin I in buffer with bovine serum albumin and sodium azide (<0.1%).

The exact concentration is indicated on each vial label.

The calibrators were calibrated against RP 86/536.

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

The vial contains angiotensin I in buffer with bovine serum albumin and sodium azide (<0.1%).

The expected value is in the concentration range indicated in a supplement.

Enzymatic inhibitor: one vial (lyophilized)

It also contains sodium azide (<0.1%).

Wash solution (20x): one 50 mL vial

Concentrated solution has to be diluted before use.

5 MATERIALS REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

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

- precision micropipettes (75 µL; 100 µL)
- adjustable dispensers (200 µL; 300 µL; 2 mL)
- water bath
- ice bath
- vortex-type mixer
- horizontal or orbital shaker
- aspiration system
- Gamma counter set for ¹²⁵I

6 RESULTS

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

6.1 Standard curve

The results in the quality control department were calculated using *weighted cubic regression* curve fit with B/T or B/B_0 on the logit vertical axis and analyte concentration of the calibrators on the log horizontal axis (ng/mL).

Other data reduction methods may give slightly different results.

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

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

6.2 Samples

For the control and samples incubated at 4 °C, or at 37 °C, locate the B/T or the B/B_0 value on the vertical axis and read off the corresponding angiotensin I concentration in ng/mL on the horizontal axis.

Calculation of plasma renin activity

The determination of plasma renin activity is performed indirectly by the measurement of the in vitro generation of angiotensin I (A-I) per hour.

Background A-I, determined on plasma samples incubated at 4 °C, is subtracted from the A-I generated at 37 °C for the calculation of PRA using the following equation:

$$\text{PRA ng of A-I /mL/h} = \frac{[\text{A-I (37 °C)} - \text{A-I (4 °C)}] \times 2}{\text{Enzymatic incubation time (hours)}}$$

Where

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

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

7 EXPECTED VALUES

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

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

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

8 QUALITY CONTROL

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

In case of packaging deterioration or if data obtained show some performance alteration, please contact your local distributor.

9 PROCEDURE

9.1 Preparation and storage of reagents

Preparation of enzymatic inhibitor solution

The content of the vials is reconstituted with the volume of cold distilled water (4 °C) indicated on the label and mixed. The reconstituted enzymatic inhibitor may be stored at 2 °C - 8 °C until the expiry date of the kit.

Preparation of wash solution

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

9.2 Enzymatic step – generation of angiotensin I

9.2.1 Remarks and recommendations

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

9.2.2 Enzymatic step – procedure

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

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

9.3 Immunoassay procedure

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

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

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

10 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

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

10.1 Sensitivity

Analytical sensitivity: 0.07 ng/mL

Functional sensitivity: 0.20 ng/mL

10.2 Specificity

The antibody used in the immunoassay is highly specific for angiotensin I.

Extremely low cross reactivity was obtained against angiotensin II.

Moreover, the influence of possible interferences on PRA result is eliminated by subtraction of background.

10.3 Precision

10.3.1 Intra-assay

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

10.3.2 Inter-assay

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

10.4 Accuracy

10.4.1 Dependence on time of enzymatic incubation

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

10.4.2 Dilution test

Plasma samples were serially diluted in the zero calibrator.

The recovery percentages were obtained between 78% and 99%.

10.4.3 Recovery test

Plasma samples were spiked with known quantities of angiotensin I.

The recovery percentages were obtained between 104% and 123%.

10.5 Measurement range

(from analytical sensitivity to highest calibrator): 0.07 to approximately 30 ng/mL.

11 LIMITATIONS

The non-respect of the instructions in this package insert may affect results significantly.

Results should be interpreted in the light of the total clinical presentation of the patient, including clinical history, data from additional tests and other appropriate information.

Do not use hemolyzed, lipemic or icteric samples.

For assays employing antibodies, the possibility exists for interference by heterophile antibodies in the patient sample. Patients who have been regularly exposed to animals or have received immunotherapy or diagnostic procedures utilizing immunoglobulins or immunoglobulin fragments may produce antibodies, e.g. HAMA, that interfere with immunoassays.

Such interfering antibodies may cause erroneous results. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies.

RADIOIMMUNOASSAY FÜR DIE IN-VITRO BESTIMMUNG DER PLASMA RENIN AKTIVITÄT (PRA) IN HUMANEM PLASMA***In-vitro-Diagnostikum.*****1 PRINZIP**

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

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

Der Assay für die Bestimmung von Angiotensin I ist ein radioimmunologischer, kompetitiver Assay. Proben und Kalibratoren werden in mit Antikörpern beschichteten Röhrchen mit einem ¹²⁵I-markierten Angiotensin I -Tracer inkubiert. Nach der Inkubation wird die Flüssigkeit abgesaugt und ungebundene markierte Antikörper werden durch Waschen entfernt. Die Menge der gebundene Radioaktivität wird in einem Gamma-Counter gemessen. Unbekannte Probenwerte werden mittels Interpolation aus der Standardkurve bestimmt.

2 WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN**2.1 Allgemeinhinweise**

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

2.2 Grundregeln der Handhabung von Radioaktivität

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

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

2.3 Natriumazid

Zur Vermeidung mikrobieller Kontamination enthalten einige Reagenzien Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei, Kupfer oder Messing zu explosiven Metallaziden reagieren. Um dies zu vermeiden, sollte bei einer Entsorgung über Rohrleitungen mit viel Wasser nachgespült werden.

2.4 Bestandteile menschlichen Ursprungs

Alle Plasmaproben sollten als potentielle Überträger von Hepatitis und AIDS behandelt und Abfälle entsprechend den jeweiligen Länderbestimmungen entsorgt werden.

2.5 GHS-GEFAHRSTOFFKLASSIFIZIERUNG

Angiotensin Tracer

WARNUNG



H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

P280 Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P362+P364 Kontaminierten Kleidungsstücke ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Reaktionsmasse aus:

5-Chloro-2-Methyl-4-Isothiazolin-3-on [EC# 247-500-7] und 2-Methyl-4-Isothiazolin-3-on [EC# 220-239-6](3:1) <0,05%

Inhibitor

GEFAHR



H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.

P201 Vor dem Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P280 Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P308+P313 BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P362+P364 Kontaminierten Kleidungsstücke ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

8-Hydroxychinolin 0,1 -0,2%

Wash Solution (20X)

GEFAHR



H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen.

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P280 Schutzhandschuhe, Schutzkleidung und Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P308+P313 BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Borsäure 0,1-0,3%

di-Natriumtetraborat-Decahydrat 0,1-0,3%

Das Sicherheitsdatenblatt ist auf Anfrage erhältlich.

3 PROBENENTNAHME, -BEHANDLUNG, -LAGERUNG UND VERDÜNNUNG

- Sammeln Sie die Plasmaproben in kalten EDTA-Röhrchen.
 - Trennen Sie die Zellen vom Plasma durch Zentrifugation bei 2 °C - 8 °C.
 - Wenn die Bestimmung nicht sofort durchgeführt wird, sollten die Proben eingefroren (bei <-20 °C, Maximum 1 Jahr) und aliquotiert werden um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu vermeiden.
- Anmerkung: Die Plasmatemperatur sollte während Sammeln bei 2 °C - 8 °C gehalten werden. Vermeiden Sie weitere Manipulationen um sowohl die Bildung als auch die Fragmentierung des Angiotensins I zu vermeiden.

4 MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Die Reagenzien sind verwendbar bis zum Verfallsdatum, wenn sie bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Lagerungskonditionen der Reagenzien nach der Rekonstitution oder Verdünnung werden im Abschnitt „Durchführung“ angegeben.

Auf die Fläschchen gedruckte Verfallsdaten betreffen nur die Langzeitlagerung beim Hersteller, vor der Zusammensetzung des Kits. Bitte nicht beachten.

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

¹²⁵I-markierte Anti-Angiotensin I -Antikörperlösung: eine 11 mL Flasche (gebrauchsfertig)

Die Flasche enthält 260 kBq (am Tag der Herstellung) des ¹²⁵I-markierten Anti- Angiotensin I in Puffer mit bovinem Serumalbumin und einem Farbstoff.

Kalibratoren: sechs Fläschchen je 1 mL (gebrauchsfertig)

Die Kalibratorfläschchen enthalten zwischen 0 bis ungefähr 30 ng/mL Anti-Angiotensin I in Puffer mit bovinem Serum mit Natriumazid (<0,1%).

Die genauen Konzentrationen sind auf jedem Fläschchen angegeben.

Die Kalibratoren wurden gegen RP 86/536 kalibriert.

Kontrollprobe: ein 1 mL Fläschchen (gebrauchsfertig)

Das Fläschchen enthält Anti- Angiotensin I in Puffer mit bovinem Serumalbumin und Natriumazid (<0,1%).

Der Konzentrationsbereich ist auf dem Etikett angegeben.

Enzyminhibitor: ein Fläschchen (lyophilisiert)

Das Fläschchen enthält Natriumazid (<0,1%).

Waschlösung (20x): eine Flasche 50 mL

Die konzentrierte Lösung muss vor Gebrauch verdünnt werden.

5 ERFORDERLICHE, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Zusätzlich zu der Standardlaborausstattung, werden die folgenden Materialien benötigt:

- Präzisionspipette (75 µL, 100 µL).
- halbautomatische Pipetten (200 µL; 300 µL; 2 mL).
- Wasserbad.
- Eisbad.
- Vortex-Mischer.
- Horizontal, oder Orbitalschüttler.
- Absaugsystem.
- Gamma-Counter für ¹²⁵I

6 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse werden aus der Standardkurve mittels Interpolation ermittelt. Die Kurve kann für die Bestimmung der Angiotensin I-Konzentration in den Proben dienen, die zur gleichen Zeit wie die Standardkurve gemessen wurden.

6.1 Standardkurve

Die Ergebnisse in der Qualitätskontrolle wurden berechnet *gewichtete kubische Regression*-Kurvenanpassung mit B/T oder B/B_0 auf der logit vertikalen Achse und der Analytkonzentration der Kalibratoren auf der logarithmischen horizontalen Achse (ng/mL) berechnet.

Andere Datenreduktions-Methoden können zu leicht abweichenden Ergebnissen führen.

Totalaktivität: 68 511 cpm				
Kalibratoren	Angiotensin I (ng/mL)	cpm (n=3)	B/T (%)	B/B ₀ (%)
0	0.00	17 444	25,5	100
1	0.30	13 732	20,0	78,7
2	1.00	9 390	13,7	53,8
3	3.00	5 431	7,93	31,1
4	10.0	2 746	4,01	15,7
5	30.0	1 243	1,81	7,13

(Beispiel einer Standardkurve, nicht zur Berechnung benutzen)

6.2 Proben

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

Bestimmung der Plasma Renin Aktivität (PRA)

Die Plasma-Renin-Aktivität (PRA) wird indirekt bestimmt durch das Messen des in vitro erzeugtes Angiotensin I (A-I) in einer Stunde.

Angiotensin I im Hintergrund wird in den bei 4 °C inkubierten Proben bestimmt und von dem bei 37 °C erzeugten Angiotensin I abgezogen. Die PRA wird dann wie folgt ermittelt:

$$\text{PRA ng von A-I /mL/h} = \frac{[\text{A-I (37 °C)} - \text{A-I (4 °C)}] \times 2}{\text{Enzymatische Inkubationszeit (h)}}$$

mit

A-I (37 °C): Angiotensin-Konzentration in ng/mL in den bei 37 °C inkubierten Proben,

A-I (4 °C): Angiotensin-Konzentration in ng/mL in den bei 4 °C inkubierten Proben,

7 ERWARTETE WERTE

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

N	Normale Erwachsene	2,5. - 97,5. Perzentile (ng/mL/h)	Median (ng/mL/h)	Min - Max (ng/mL/h)
38	Frühmorgens, liegend	0,32 - 1,84	0,79	0,30 - 1,90
41	2 Stunden aufrecht	0,60 - 4,18	2,20	0,48 - 4,88

Detaillierte Information über die erwarteten Kinderwerte (aufgeschlüsselt nach Alter) sind im "APPENDIX" aufgeführt.

8 QUALITÄTSKONTROLLE

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

Im Falle von Verpackungsschäden oder einer Leistungsbeeinträchtigung des Produkts, kontaktieren Sie bitte Ihren lokalen Vertreter.

9 DURCHFÜHRUNG

9.1 Präparation der Reagenzien

Präparation des Enzyminhibitors

Den Inhalt der Flasche wird mit einem auf dem Etikett angegebenen Volumen kalten (4 °C) destillierten Wassers wiederaufgenommen und homogenisiert.

Die rekonstituierte Lösung sollte bei 2 °C - 8 °C gelagert werden bis zum Verfallsdatum.

Präparation der Waschlösung

Den Inhalt der Flasche in 950 mL destilliertes Wasser schütten und homogenisieren.

Die verdünnte Lösung ist bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.

9.2 Enzymatisches Schritt –Bildung des Angiotensins I

9.2.1 Anmerkungen und Empfehlungen

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

9.2.2 Enzymatisches Schritt –Durchführung

Warnung: Kalibratoren und Kontrollprobe müssen nicht behandelt werden

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

9.3 Testdurchführung

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
Zugabe	Inkubation	Messung
Den beschichteten Röhrchen in dieser Reihenfolge zugeben: 75 µL Kalibrator, Kontrolle oder Probe nach der enzymatischen Inkubation bei 37 °C und bei 4 °C und jeweils 100 µL Tracer.** Mischen	2 Stunden bei 18 °C - 25 °C mit Schütteln (> 280 rpm).	Vorsichtig den Inhalt der Röhrchen absaugen (außer den zwei Röhrchen für Totalaktivität). Mit 2 mL Waschlösung waschen und zweimal absaugen. Aktivität (cpm) bestimmen (1min).

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

** Geben Sie je 100 µL Tracer in 2 zusätzliche Röhrchen, um die Totalaktivität zu erhalten.

10 SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

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

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

10.1 Empfindlichkeit

Analytische Sensitivität: 0,07 ng/mL

Funktionelle Sensitivität: 0,20 ng/mL

10.2 Spezifität

Der in diesem Immunoassay verwendete Antikörper ist höchst spezifisch für Angiotensin I.

Eine extrem niedrige Kreuzreaktion wurde mit Angiotensin II festgestellt.

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

10.3 Präzision

10.3.1 Intra-Assay

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

10.3.2 Inter-Assay

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

10.4 Genauigkeit

Abhängigkeit von der enzymatischen Inkubationszeit

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

10.4.1 Verdünnungstest

Hoch konzentrierte Proben wurden mit Nullkalibrator verdünnt. Die erhaltene Wiederfindung lag zwischen 78% und 99%.

10.4.2 Wiederfindungstest

Plasma Proben wurden mit definierten Angiotensin I-Mengen vermischt. Die erhaltene Wiederfindung lag zwischen 104% und 123%.

10.5 Messbereich

(von der analytischen Sensitivität bis zum höchsten Kalibrator): 0,07 bis ungefähr 30 ng/mL.

11 EINSCHRÄNKUNGEN

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

Die erhaltenen Ergebnisse sind vor dem Hintergrund der gesamten klinischen Situation des Patienten unter Berücksichtigung seiner klinischen Vorgeschichte, den Ergebnissen anderer Testergebnisse sowie weiteren vorliegenden Informationen zu interpretieren.

Es dürfen keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwendet werden.

Bei Assays, die Antikörper nutzen, besteht die Möglichkeit einer Störung durch in der Patientenprobe enthaltene heterophile Antikörper. Patienten, die regelmäßig mit Tieren in Kontakt kommen oder sich immuntherapeutischen oder -diagnostischen Verfahren unter Einsatz von Immunglobulinen oder Immunglobulin-Fragmenten unterzogen haben, können Antikörper bilden (wie bspw. HAMA), welche die Immunoassays stören.

Derartige störende Antikörper können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

Die Ergebnisse von Patienten, bei denen das Vorliegen derartiger Antikörper zu vermuten ist, sind sorgfältig zu untersuchen.

12 APPENDIX - PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

Accuracy**Dependence on time of enzymatic incubation**

No dependence of PRA on time was observed.

Time, minutes		60	120	180
PRA ng/mL/hour	Sample A	0.30	0.32	0.33
	Sample B	0.56	0.48	0.53
	Sample C	1.04	1.15	1.19
	Sample D	1.64	1.56	1.65
	Sample E	5.12	5.19	4.93

Dilution test

Three plasma samples were diluted with the zero calibrator and assayed according to the procedure of the kit.

Sample	Dilution	Theoretical conc. (ng/mL)	Observed conc. (ng/mL)	Recovery (%)
A	undiluted	-	2.45	-
	1/2	1.23	1.21	98.8
	1/4	0.61	0.56	91.4
	1/8	0.31	0.27	88.2
B	undiluted	-	3.05	-
	1/2	1.53	1.46	95.7
	1/4	0.76	0.64	83.9
	1/8	0.38	0.34	89.2
C	undiluted	-	9.21	-
	1/2	4.61	4.30	93.4
	1/4	2.30	1.82	79.0
	1/8	1.15	0.90	78.2
	1/16	0.58	0.45	78.2

Recovery test

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

Initial conc. (ng/mL)	Added angiotensin (ng/mL)	Observed conc. (ng/mL)	Observed addition (ng/mL)	Recovery (%)
0.88	1.01	1.89	2.09	111
	1.30	2.18	2.68	123
	1.93	2.81	3.20	114
1.39	1.01	2.40	2.64	110
	1.30	2.69	2.98	111
	1.93	3.32	3.59	108
1.54	1.01	2.54	2.84	112
	1.30	2.84	3.31	117
	1.93	3.46	4.03	116
2.60	1.01	2.54	2.84	112
	1.30	2.84	3.31	117
	1.93	3.46	4.03	116
2.62	1.01	3.62	3.75	104
	1.30	3.92	4.19	107
	1.93	4.55	4.82	106

Precision**Intra-assay**

Samples	1	2
Number of determinations	25	25
PRA, ng/mL/hour	1.49	2.94
CV (%)	11.25	11.25

Inter-assay

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

Samples	A	B	C	D	E
Number of determinations	10	10	10	10	10
PRA, ng/mL/hour	0.69	3.37	7.08	15.1	24.2
CV (%)	20.9	9.57	8.72	9.74	11.8

Specificity

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

Expected data for children

Results are sorted according to age.

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

¹²⁵I Characteristics

$T_{1/2}({}^{125}\text{I}) = 1443 \text{ h} = 60.14 \text{ d}$

¹²⁵ I	E (MeV)	%
γ	0.035	
X	0.027	114
	0.032	25

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité