

## НАБІР РЕАГЕНТІВ

### АНГІОТЕНЗИН II

#### Angiotensin II RIA

Каталог. №: **RIA-3020**  
Кількість: **100**

Дата випуску інструкції: **2019/03**  
Версія **4.0**



Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.

#### 1. ПРИЗНАЧЕННЯ

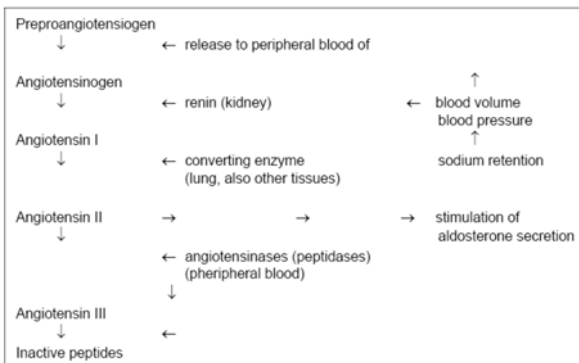
Радіоімунний аналіз для кількісного *in vitro* вимірювання Ангіотензину II у ЕДТА плазмі.

#### 2. КЛІНІЧНА ОСНОВА

##### 2.1 Біологічна активність

Ангіотензин II – це біологічно активний продукт ренін-ангіотензинової системи (1,2).

Октапептид ангіотензину II (молекулярною масою 1046) є найсильнішим відомим фізіологічним вазоконстриктором. З великого білка-попередника (пре-проангіотензиноген), синтезованого в печінці, він вивільняється в серії протеолітичних стадій, які каталізуються ферментами з різних тканин (1, 2, 4). Ангіотензин II дуже короткочасний в плазмі: коли він генерується з ангіотензину I, він деградується далі в фізіологічно неактивні пептиди різними плазмовими пептидазами, при плазмі напіврозпаду менше хвилини (5). Нижче наведена схема так званої ренін-ангіотензинової системи:



##### 2.2 Клінічне застосування

Оскільки генерування ангіотензину II з ангіотензиногену через ангіотензин I сильно впливає на зміни активності реніну, слід враховувати всі зовнішні фактори, які впливають на його активність: активність реніну підвищується під час вагітності, після зниження натрію, у вертикальному положенні і під впливом ряду лікарських засобів, наприклад, оральні контрацептиви, адреналін, антигіпертензивні вазодилататори, діуретики, високі дози спіроналактону та прогестерону. Факторами, що знижують активність реніну, є: горизонтальне положення, збільшення поглинання натрію, а-метил-DOPA, L-DOPA, пропранолол, резерпін, клонідин і старість. Активність реніну також піддається добовому ритму з піковими значеннями вранці. Радіоімунаналіз ангіотензину II має своє встановлене застосування при лікуванні та моніторингу гіпертензії.

#### 3. ПРИНЦИП МЕТОДУ

Після екстракції зразків плазми ангіотензин II аналізується конкурентним радіоімунаналізом. Цей радіоімунологічний аналіз використовує антисироватку кролячого антиангіотензину II і радіоіодированого індикатору ангіотензину II. Зв'язану і вільну фази відокремлюють другим антитілом, пов'язаним з частинками твердої фази, після чого проводять стадію центрифугування. Вимірюють радіоактивність у зв'язаних фракціях і генерують типову стандартну криву.

#### 4. РЕАГЕНТИ, ЯКІ НАДАЮТЬСЯ

	Реагенти	100 тестів набору	Розведення
<b>Ab</b>	Антисироватка: Антисироватка кролячого анти-ангіотензину II	1 флакон Ліофілізований	<b>Додайте</b> 22 мл дистильованої води
<b>Ag <sup>125</sup> J</b>	ІНДИКАТОР: <sup>125</sup> Мічений йодом ангіотензин II у фосфатному буфері з людським сироватковим альбуміном і NaN <sub>3</sub> .	1 флакон Ліофілізований 56 kBq	<b>Додайте</b> 25 мл дистильованої води
<b>DASP</b>	Тверда фаза подвійного антитіла: Козячий анти – кролячий Ig's зв'язаний з твердою фазою у фосфатному буфері з альбуміном людської сироватки, Tween та азид натрію. (<0.1%)	1 флакон 11 мл	<b>Готовий</b> до використання
<b>ASS BUF</b>	Буфер для аналізу: Фосфатний буфер містить альбумін людської сироватки та азид натрію, (<0.1%).	2 флакони 50 мл	<b>Готовий</b> до використання
<b>CAL</b>	Ангіотензин II калібратор, 300 пмоль/л.	1 флакон ліофілізований	<b>Додайте</b> 5 мл дистильованої води
<b>CONTROL N</b>	Контролі – N = 1 або 2	2 флакони ліофілізовані	<b>Додайте</b> 2 мл дистильованої води

#### 5. МАТЕРІАЛ, ЯКИЙ НЕ ПОСТАЧАЄТЬСЯ

Наступний матеріал, який необхідний, але не постачається в наборі:

1. Піпетки (100 мкл, 200 мкл, 1.00 мл, 2.00 мл, 5.00 мл).
2. Повторювальні дозатори (100 мкл, 200 мкл)
3. Вимірювальний циліндр 25 мл.
4. Полістерольні, поліпропіленові або скляні пробірки.
5. Вортекс
6. Холодильна центрифуга
7. Етанол р. А 98%
8. Вас-концентратор або N<sub>2</sub> (нітроген)
9. Крижана ванна

#### 6. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

- А. Антисироватка:**  
Розведіть з 22 мл дистильованої води. Обережно перемішайте. Стабільна при температурі -20°C принаймні 3 місяці після розведення.
- В. <sup>125</sup>I-Ангіотензин II:**  
Розведіть з 25 мл дистильованої води. Обережно перемішати. Стабільний при -20°C до закінчення терміну придатності.
- С. Тверда фаза подвійного антитіла:**  
Готовий до використання. Окремий реагент слід помістити на магнітну мішалку протягом 10 хвилин. Можна піпетувати реагент з повторюваним дозатором. Стабільний при 2 °C - 8 °C.
- Д. Буфер для аналізу:**  
Готовий до використання. Стабільний при 2 °C - 8 °C до закінчення терміну придатності.
- Е. Ангіотензин II Калібратор 300 пмоль/л:**  
Розведіть з 5 мл дистильованої води. Обережно перемішайте. Стабільний при температурі -20 °C щонайменше протягом 3 місяців після розведення.
- Ф. Контролі:**  
Розведіть кожний флакон з 2 мл дистильованої води. Стабільний при -20°C протягом 3 місяців після розведення. Концентрація контролю вказана на етикетці флакону і в листі QC (без екстракції).

ГОТУЙТЕ ВСІ РЕАГЕНТИ ЗА 15 ХВИЛИН ДО ВИКОРИСТАННЯ!

#### 7. ЗБЕРІГАННЯ ТА ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ РЕАГЕНТІВ

Цей набір стабільний до вказаного терміну придатності за умови

відповідного зберігання. Після отримання набору, всі реактиви слід зберігати при температурі від 2 °С до 8 °С.

Розведені реагенти слід зберігати відповідно до розділу 6.

Розведені реагенти стабільні відповідно до розділу 6, але не довше, ніж до терміну придатності.

## 8. ЗАБІР ЗРАЗКІВ

Рекомендується ретельна стандартизація умов підготовки та відбору проб пацієнта. У зв'язку з надзвичайною лабільністю ангіотензину II у біологічній рідині необхідно багато уваги приділяти правильному збору проби крові:

- Забір крові здійснюють пацієнту, який нічого не їв, в положенні лежачи в холодну трубку, що містить ЕДТА;
- Центрифугувати негайно при температурі 4°C для того, щоб відділити плазму;
- Заморозити зразки негайно у пластикових пробірках при температурі -20°C до проведення аналізу.

## 9. ПРОЦЕДУРА

### 9.1 Процедура екстракції плазми

1. Позначте одну пробірку для екстракції для кожного зразка пацієнта. Позначте одну додаткову трубку, щоб оцінити відновлення екстракції.
2. Розмістіть пробірки для екстракції та етанол на льоду.
3. Піпетуйте 1.0 мл кожного зразка у відповідні позначені пробірки для екстракції. НЕ ЕКСТРАКТУЙТЕ СТАНДАРТИ ТА КОНТРОЛІ.
4. Підготувати трубку для оцінки відновлення:
  - Піпетуйте 1.0 мл випадкового зразка плазми у пробірку для відновлення. Зразок, використаний для цього аналізу відновлення, повинен мати білкову матрицю, подібну до зразків, які тестуються.
  - Додайте 200 мкл <sup>125</sup>I-ангіотензину II тресеру у цю пробірку.
  - Екстрагуйте цей зразок разом із зразками на етапі 6.
5. Підготуйте пробірку для Повного відновлення:
  - Піпетуйте 200 мкл <sup>125</sup>I-ангіотензину II тресера у дві пробірки.
  - Додайте 200 мкл буфера для аналізу та перемішайте.
  - Накрийте та відкладіть в сторону цю пробірку для розрахунку відновлення.
6. Додайте 4 мл охолодженого етанолу до кожного зразку та Відновлювальної пробірки.
7. Перемішайте та крутіть протягом 2 хвилин.
8. Центрифугуйте всі екстракційні трубки при 2000 g. протягом 15 хвилин при 2 °С - 8 °С.
9. Декантуйте супернатант з кожної екстракційної трубки в попередньо підготовлені чисті, відповідним чином позначені 16 × 100 мм трубки.
10. Випаруйте супернатанти під струмом азоту до сухості (при максимальній температурі 37 °С).
11. Розведіть висушені зразки додавши 1.0 мл буфера для аналізу та ретельно прокрутіть.
12. Продовжуйте процедуру RIA негайно або зберігайте екстраговані зразки при температурі -20 °С до двох тижнів перед використанням в аналізі.
13. Розведіть осушений відновлений зразок додавши 1.0 мл буфера для аналізу та ретельно прокрутіть.
14. Піпетуйте 400 мкл відновлюваної пробірки для відбору зразка в дві пробірки розміром 12 × 75 мм.
15. Підрахуйте загальну кількість відновлення та відновлювальних пробірок протягом щонайменше двох хвилин у гамма-лічильнику.

### Обчислення відновлення:

Обчисліть % відновлення шляхом ділення cpm в пробірках для відновлення (R) cpm в повних пробірках відновлення і помножте на 1.0 / 0,4:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{cpm recovery tube} \times 1.0}{\text{cpm total recovery tube} \times 0.4} \times 100$$

### 9.2 Підготовка розчинів для калібраторів

Розведення	Ангіотензин II Калібратор	Концентрація 300 пмоль/л
1000 мкл Ангіотензин II Калібратор + 1000 мкл буферу для аналізу, вортекс	Калібратор А	150 пмоль/л
1000 мкл Калібратор А + 1000 мкл буфер для аналізу, вортекс	Калібратор В	75 пмоль/л

Перекладач Романюк Н.П.

1000 мкл Калібратор В + 1000 мкл буфер для аналізу, вортекс	Калібратор С	37.5 пмоль/л
1000 мкл Калібратор С + 1000 мкл буфер для аналізу, вортекс	Калібратор D	18.8 пмоль/л
1000 мкл Калібратор D + 1000 мкл буфер для аналізу, вортекс	Калібратор E	9.4 пмоль/л
1000 мкл Калібратор E + 1000 мкл буфер для аналізу, вортекс	Калібратор F	4.7 пмоль/л

### 9.3 Процедура аналізу

1. Зберігайте пробірки для аналізу та реагенти на крижаній бані під час всіх етапів піпетування.
2. Піпетуйте 400 мкл кожного стандарту, 400 мкл контролів та 400 мкл кожного екстракту плазми у дублікаті у відповідні позначені полістирольні пробірки.
3. Додайте 400 мкл буферу для аналізу до макс. зв'язаних пробірок (0 пмоль/л).
4. Додайте 600 мкл буферу для аналізу до NSB (бланк) пробірок.
5. Додайте 200 мкл антисироватки ангіотензину II у кожен пробірку, за винятком бланк та ТС-пробірок.
6. Крутіть та інкубуйте протягом 6 б годин при температурі 4°C.
7. Додайте 200 мкл <sup>125</sup>I-Ангіотензин II тресеру до усіх пробірок.
8. Крутіть всі пробірки та інкубуйте при температурі 4°C протягом 18-22 годин.
9. При безперервному перемішуванні додайте 100 мкл подвійного антитіла твердої фази до всіх пробірок, за винятком ТС-пробірок.
10. Крутіть та інкубуйте 30 - 60 хвилин при 4°C.
11. Центрифугуйте всі пробірки протягом 15 хвилин при 1700 g при 4°C або кімнатній температурі.
12. Обережно декантуйте супернатанти.
13. Підрахуйте залишок протягом 1-2 хвилин.

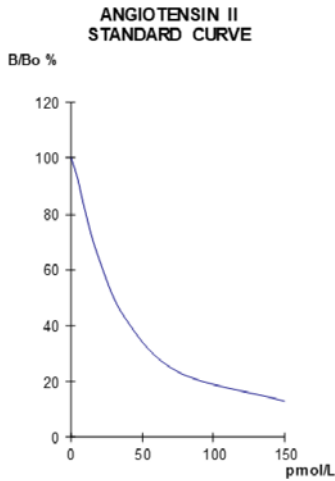
### 10. ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Відніміть середню швидкість відліку (срм) NSB від середньої швидкості рахунку (срм) повторюваних стандартів, контролів і зразків пацієнтів.
2. Стандартну криву можна створити, побудувавши графік срм,% V/V<sub>0</sub> або %B/T осадженої зв'язаної фракції, проти концентрації стандартів ангіотензину II.
3. Щоб отримати концентрацію ангіотензину II у екстрагованих зразках та контролях пацієнта, їх срм,% V/V<sub>0</sub> або B/T осаджених зв'язаних фракцій інтерполюють тепер з отриманої стандартної кривої.
4. Стандартну криву також можна побудувати комп'ютерними методами. Для автоматичного зменшення даних можна використовувати як logit / log, так і Spline методи.
5. Виправте значення плазми для відновлення % екстракції.

### Дані стандартної кривої

	Середнє срм	Виправлені срм	% V/V <sub>0</sub>	Результати (пмоль/л)
Загальна кількість NSB	18582			
Калібратор 0 пмоль/л	9559	8881	100	
Калібратор F 4.7 пмоль/л	8880	8202	92.4	
Калібратор E 9.4 пмоль/л	7957	7279	82.0	
Калібратор D 18.8 пмоль/л	7039	5781	65.1	
Калібратор С 37.5 пмоль/л	4508	3830	43.1	
Калібратор В 75 пмоль/л	2770	2099	23.6	
Калібратор А 150 пмоль/л	1846	1168	13.1	
Контроль низький	7359	6681	75.2	13.1
Контроль високий	3145	2467	27.8	63.1

### Приклад стандартної кривої



## 11. ЕФЕКТИВНІСТЬ І ОБМЕЖЕННЯ

### 11.1 Чутливість

Чутливість, що оцінюється як зміна 3 стандартних відхилень від нульового калібратора, становить 2.0 пмоль/л.

### 11.2 Точність

Within-run				
	n	Mean pmol/L	SD	% CV
sample A	20	13.3	0.44	3.3
sample B	20	64.9	1.97	3.0

Between-run				
	n	Mean pmol/L	SD	% CV
sample A	6	11.6	0.55	4.8
sample B	6	60.9	2.4	3.9

### 11.3 Правильність

#### Відновлення

Чотири різних зразки були додані з різними кількостями стандарту ангіотензину II

Зразок	Очік. конц. (пмоль/л)	Отрим. конц. (пмоль/л)	% відновлення
A1	12.4	12.3	99.2
A2	23.9	23.5	96.8
A3	27.2	22.0	103.0
A4	46.0	51.1	111.0

### 11.4 Специфічність

Антисироватка Ангіотензину II підвищена у кроликів. Наступні перехресні реактивності виміряні при 50% В/В<sub>0</sub>.

Пептид	Перехресна-реакція
Ангіотензин II	100
Ангіотензин I	<0.1
Leu-Гептапептид	100
Asn <sup>1</sup> -Val <sup>5</sup> Ангіотензин II	30
Sar <sup>1</sup> Ile <sup>8</sup> Ангіотензин II	100
Ангіотензин III	80

### 11.5 Інтерференція

Зразки, що показують мутність, гемоліз, гіперліпемію або містять фібрин, можуть давати неточні результати.

## 12. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Контролі повинні виконуватися в кожному аналізі. У комплект входять два контролі, значення (без процедури екстракції) вказані на контрольній таблиці та етикетках флаконів. Використовуйте контролі, рекомендовані виробником контрольної плазми, і відповідно до практики лабораторних лабораторій для моніторингу точності та точності реагентів та методів.

## 13. РЕФЕРЕНТНІ ІНТЕРВАЛИ

Кожна лабораторія повинна встановити свій нормальний діапазон очікуваних значень.

Зразки крові взяті з 11, очевидно, здорових дорослих (з 09.00 - 10.00 ранку) і визначено рівні ангіотензину II.

Отриманий діапазон: 19 - 38 пмоль/л

## 14. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

### Безпека

Тільки для діагностики *in vitro*.

Матеріали, отримані з крові людини і використані при приготуванні цього набору, тестували і виявили негативним для поверхневого антигену гепатиту В (HBsAg), антитіл до HCV і антитіл до ВІЛ-1 і ВІЛ-2. Проте, обробляйте всі компоненти як можливе джерело інфекції.

Реагенти в цьому наборі містять азид натрію. Контакт з мідними або свинцевими трубками може призвести до накопичення вибухонебезпечних азидних відкладень. При утилізації реагентів у каналізацію завжди промивайте великою кількістю води, що запобігає утворенню азиду металів. Водопровід, за підозрою в забрудненні цими вибухонебезпечними відкладами, слід ретельно очистити 10% розчином гідроксиду натрію.

Цей набір містить 125I (період напіврозпаду: 60 днів), випромінюючи іонізуючі X (28 keV) та γ (35.5 keV). Радіоактивний матеріал, який міститься може бути отриманий, придбаний, зберігатися і використовуватися лише лікарями, клінічними лабораторіями або лікарнями для клінічних або лабораторних тестів *in vitro*, які не передбачають внутрішнього або зовнішнього введення матеріалу або випромінювання з нього, людям або тваринам. Його отримання, придбання, володіння, використання та передача підлягають регулюванню кожної країни.

Дотримання основних правил радіаційної безпеки повинно забезпечувати адекватний захист.

- Не їсти, не пити, де використовуються радіоактивні матеріали.
- Не піпетуйте ротом радіоактивні розчини.
- Уникайте безпосереднього контакту зі всіма радіоактивними матеріалами, використовуючи такі захисні вироби, як лабораторний халат та одноразові рукавички.
- Вся рентгенологічна робота повинна проводитися у визначеному місці.
- Радіоактивні матеріали повинні зберігатися в оригінальних контейнерах у визначеному місці.
- Лабораторне обладнання та скляний посуд, які підлягають забрудненню, повинні бути відокремлені для запобігання перехресного забруднення різних радіоізотопів.
- Будь-які радіоактивні розливи повинні негайно прибиратися відповідно до встановлених процедур.
- Усі радіоактивні речовини повинні бути утилізовані згідно з чинними нормативними актами та настановами агентства юрисдикції над лабораторією.



### ВИРОБНИК

DRG Instrumente GmbH  
вул. Фраунберг 18, 35039  
м. Марбург, Німеччина  
Тел: +49(0)64 21/170 00  
Факс: +49(0)64 21/170 00  
[www.drq-diagnostics.de](http://www.drq-diagnostics.de)  
e-mail: [drq@drq-diagnostics.de](mailto:drq@drq-diagnostics.de)



### УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

