

Instructions for use**Plasma Renin Activity (PRA) ELISA**

Please use only the valid version of the Instructions for use provided with the kit

REF**MS E-5600****IVD**

Plasma Renin Activity (PRA) ELISA

English

INTENDED USE

For the quantitative determination of Plasma Renin Activity (PRA) in human plasma by an enzyme immunoassay.
For *in vitro* diagnostic use.

PRINCIPLE OF THE TEST

This kit measures PRA and the results are expressed in term of mass of angiotensin-I (Ang-I) generated per volume of human plasma in unit time (ng/ml.h).

The blood sample is collected in a tube that contains EDTA. The plasma is separated and either stored frozen or kept at room temperature for immediate use, samples should not be chilled on ice or stored at temperatures between 0 and 10°C during collection or processing before adjustment of pH, this could lead to overestimation of renin activity. Before the start of immunoassay a protease inhibitor and the Generation buffer is added to the plasma sample, which will prevent Angiotensin-I (Ang-I) in plasma from degradation. The pH of the plasma sample should be around 6.0 after the addition of the supplied Generation buffer. The plasma sample is split in two and the fractions are incubated at 0–4°C (in ice bath) and 37°C respectively for 90 minutes or longer, to allow the generation of Ang-I by plasma renin at 37°C. Optionally, the pH can be adjusted to 6.5 or 7.4. Adjustment of pH is a critical step during the assay, acidification of plasma to pH 3.3 or lower for prolonged time with subsequent return to neutral pH causes irreversible activation of the renin (Derkx et al., 1987), on the other side incubation at pH higher than 8.0 can destroy renin. During the immunoassay incubation, another set of protease inhibitors are involved, which function to stop the new generation as well as degradation of Ang-I to smaller peptides.

The immunoassay of Ang-I is a competitive assay that uses two incubations, with a total assay incubation time of less than two hours. During the first incubation unlabelled Ang-I (present in the standards, controls and plasma samples) competes with biotinylated Ang-I to bind to the anti-Ang-I antibody. In the second incubation the labelled Streptavidin- HRP conjugate, binds to the immobilized Ang-I-Biotin. The washing and decanting procedures remove unbound materials. The colorimetric HRP substrate is added and, after stopping the color development reaction, the light absorbance (OD) is measured in a microplate reader. The absorbance values are inversely proportional to the concentration of Ang-I in the sample. A set of standards is used to plot a standard curve from which the concentrations of Ang-I in the samples and controls can be directly read.

CLINICAL APPLICATIONS

Measurement of PRA is important for the clinical evaluation of hypertensive patients. In particular, determination of plasma renin activity can help in the diagnosis of primary hyperaldosteronism (5–13% of hypertensive cases) and assist in the therapy and management of other forms of hypertension. PRA, in contrast to the determination of renin concentration, is a more accurate indicator of primary hyperaldosteronism (PHA), because of several reasons:

1. PRA is the expression of the rate of Ang-I formation through the enzymatic action of renin on its substrate, angiotensinogen, therefore PRA depends not only on renin concentration but also on the concentration of angiotensinogen which is ignored in the renin concentration assay.
2. Plasma renin concentration assay does not ensure sensitivity in low renin states, while the sensitivity of the PRA assay can be enhanced by increasing the incubation time during the generation step (Sealey et al., 2005).
3. When an inhibitor is bound to the renin active site PRA is inhibited, whereas the presence of the inhibitor does not affect the recognition of renin by currently available immunoassays, therefore total renin concentration does not always correlate with plasma renin activity (Campbell et al., 2009).

Renin liberates angiotensin-I from angiotensinogen. Angiotensin-I is transformed to angiotensin-II largely in pulmonary circulation by angiotensin converting enzyme (ACE). Angiotensin-II raises blood pressure by direct arteriolar vasoconstriction, promoting sodium retention, and stimulating the secretion of aldosterone from the adrenal cortex. Aldosterone also exerts an effect to restore sodium balance and lift arterial pressure. Accurate measurement of the concentration of circulating angiotensin-II is challenging because of its instability in blood samples. Aldosterone concentration can be easily determined using the Aldosterone ELISA immunoassay kit.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. Ang-I is presently not included in any external QC schemes. Therefore, each laboratory is suggested to establish its own internal QC materials and procedure for assessing the reliability of results.
3. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
4. All kit reagents and specimens should be at room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and plasma specimens.
5. A standard curve must be established for every run. The kit controls should be included in every run and fall within established confidence limits.
6. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.

7. The substrate (TMB) solution is sensitive to light and should always be stored in dark bottles away from direct sunlight.
8. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, standard and controls.
9. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the controls do not reflect established ranges. The performance of this assay is markedly influenced by the correct execution of the washing procedure!

LIMITATIONS

1. This kit is specifically designed and validated for the determination of renin activity/Ang-I generation in EDTA plasma. Other sources of material should be validated before being applied.
2. The Ang-I level depends on multiple factors, including renin activity, renin substrate concentration, the plasma pH, temperature and selection of inhibitors. Therefore, only carefully prepared plasma samples are suitable for this test.
Bacterial contaminations, repeated freeze and thaw cycles and dilution of plasma samples may affect the assay result.
3. The interpretation of the results should recognise the conditions that can affect renin secretion, such as sodium and potassium intake, posture, medications like diuretics, chlomidine, beta-blockers, estroprogestogens and peripheral vasodilators.
4. Do not use grossly haemolysed, lipaemic, icteric plasma, and any sample that was not handled properly according to the instruction.
5. The results obtained with this kit should not be used as the sole basis for clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient’s background including the frequency of exposure to animal products if false results are suspected.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

All reagents in this kit should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen. Human plasma samples should be handled as if capable of transmitting infections and in accordance with good laboratory practices.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing PMSF and hydrogen peroxide. If contacted with any of these or other reagents in this kit, wash with plenty of water.


REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Disodium EDTA (2 mg/ml blood) collection tubes
2. Single and multi-channel pipettes and disposal tips
3. Distilled or deionized water
4. Disposable test tubes (glass or polypropylene)
5. Plate shaker
6. Microplate absorbance reader equipped with a 450 nm filter
7. 37°C incubator
8. Ice bath
9. 95% Ethanol

REAGENTS PROVIDED

- 1. AA E-0030** **WASH-CONC 10x** **Wash Buffer Concentrate** – Requires Preparation X10
- Contents: Two bottles containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.
- Volume: 2x50 ml/bottle
- Storage: Refrigerate at 2-8°C
- Stability: 12 months or as indicated on label.
- Preparation: Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If one whole plate is to be used dilute 50 ml of the wash buffer concentrate in 450 ml of water.

2. MS E-5655 **SUBSTRATE** **TMB Substrate** - Ready To Use.
 Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.
 Volume: 32 ml/vial
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: 12 months or as indicated on label.

3. MS E-5680 **STOP-SOLN** **Stopping Solution** - Ready To Use.
 Contents: One bottle containing 1M sulfuric acid.
 Volume: 12 ml/bottle
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: 12 months or as indicated on label.
 Hazards identification: 

H290 May be corrosive to metals.
 H314 Causes severe skin burns and eye damage.

4. Standards and Controls- Ready To Use.

Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations:

Cat. no.	Symbol	Standard	Concentration*	Volume/Vial
MS E-5601	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	2.0 ml
MS E-5602	STANDARD B	Standard B	0.2 ng/ml	0.7 ml
MS E-5603	STANDARD C	Standard C	0.5 ng/ml	0.7 ml
MS E-5604	STANDARD D	Standard D	1.5 ng/ml	0.7 ml
MS E-5605	STANDARD E	Standard E	4 ng/ml	0.7 ml
MS E-5606	STANDARD F	Standard F	10 ng/ml	0.7 ml
MS E-5607	STANDARD G	Standard G	25 ng/ml	0.7 ml
MS E-5608	STANDARD H	Standard H	60 ng/ml	0.7 ml
MS E-5651	CONTROL 1	Control 1	Refer to vial labels for acceptable range!	0.7 ml
MS E-5652	CONTROL 2	Control 2		0.7 ml

* Approximate value - please refer to vial labels for exact concentrations.

Contents: Synthetic angiotensin-I peptide in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. The standards are calibrated against the World Health Organization reference reagent NIBSC code 86/536.
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label.

5. MS E-5613 **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** - Ready To Use.
 Contents: One bottle containing protein-based buffer with a non-mercury preservative.
 Volume: 40 ml/bottle
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: 12 months or as indicated on label.

6. MS E-5631 **96** **Rabbit Anti-Ang-I Antibody Coated Microplate** - Ready To Use.
 Contents: Two 96 well pre-coated microplates in a resealable pouch with desiccant.
 Storage: Refrigerate at 2-8°C
 Stability: 12 months or as indicated on label.

7. MS E-5640 CONJUGATE-CONC 100 **Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate Concentrate** – Requires Preparation X100

Contents: Streptavidin-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
Volume: 0.5 ml/vial
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.
Preparation: Dilute the conjugate concentrate 1:100 in assay buffer before use. The working conjugate solution is stable for 8 hours; discard the unused solution after this period.

8. MS E-5610 BIOTIN-AB **Angiotensin-I-Biotin Conjugate** - Ready To Use

Contents: One bottle containing buffer, protease inhibitors, Angiotensin-I-Biotin conjugate and a non-mercury preservative.
Volume: 30 ml/bottle
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months in unopened vial or as indicated on label.

9. MS E-5614 PMSF **PMSF** – Requires Preparation

Contents: One bottle containing phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF).
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.
Preparation: Reconstitute by adding 0.5 ml of 95% ethanol to the bottle and vortex for two minutes to completely dissolve the PMSF. Refrigerate after first use, vortex again to re-dissolve contents. Do not keep the bottle open unnecessarily.

10. MS E-5515 BUFF **Generation Buffer** - Ready To Use.

Contents: Buffer and non-toxic antibiotic.
Volume: 5 ml/bottle
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

A minimum of 0.5 ml of plasma is required per duplicate determination. Appropriate sample collection is essential to the accurate determination of angiotensin-I. The *in-vitro* generation and degradation of angiotensin-I can be minimized by the following recommended collection procedure:

1. Collect 2 ml of blood into an EDTA venipuncture tube or syringe.
2. Centrifuge blood for 15 minutes at 5000 rpm at room temperature.
3. Transfer plasma sample to a test tube at room temperature.
4. If samples are to be assayed now proceed to the Angiotensin-I generation procedure, otherwise freeze samples immediately at -20°C or less. Avoid freezing and thawing samples more than once.

ANGIOTENSIN-I GENERATION PROCEDURE

1. If a freshly drawn plasma sample is being used proceed to step 2.
If frozen plasma samples are being used thaw them as follows. Quickly bring frozen plasma samples to room temperature by placing the tubes in a container with room temperature water.
2. Transfer 0.5 ml of the plasma sample into a test tube.
3. Add 5 µl of the PMSF solution to the 0.5 ml of plasma sample (1:100 ratio). Vortex the tube to mix thoroughly.
4. Add 50 µl of the generation buffer to the treated sample from step 3 (1:10 ratio). Vortex the tube again to mix thoroughly.
5. Divide the treated sample from step 4 equally into two aliquots by transferring 0.25 ml into two test tubes. Incubate one aliquot for 90 minutes or longer (do not exceed 180 minutes) at 37°C, place the second aliquot on an ice bath (0°C). Be sure to record the incubation time used for the aliquots as this is used for calculations.
6. At the end of the incubation period place the 37°C aliquot on the ice-bath for 5 minutes to cool it down quickly.
7. Bring both aliquots to room temperature by placing in a bath with room temperature water for 5–10 minutes (do not exceed 10 minutes).

ASSAY PROCEDURE

1.	Allow all kit components to reach room temperature. Remove the required number of well strips and assemble into the plate frame.
2.	Pipette 50 µl of each standard, control and treated plasma sample (both 37°C and 0°C aliquots) into correspondingly labelled wells in duplicate.
3.	Pipette 100 µl of the angiotensin-I-biotin conjugate into each well <i>(the use of a multichannel pipette is recommended).</i>
4.	Incubate on a plate shaker (~200 rpm) for 60 minutes at room temperature.
5.	Wash the wells 5 times each time with 300 µl/well of diluted wash buffer . After washing tap the plate firmly against absorbent paper to remove any residual liquid <i>(the use of an automatic strip washer is strongly recommended).</i> <i>The performance of this assay is markedly influenced by the correct execution of the washing procedure!</i>
6.	Pipette 150 µl of the streptavidin-HRP conjugate working solution into each well <i>(the use of a multichannel pipette is recommended).</i>
7.	Incubate on a plate shaker (~200 rpm) for 30 minutes at room temperature.
8.	Wash the wells 5 times with the same procedure as in step 5.
9.	Pipette 150 µl of the TMB substrate into each well <i>(the use of a multichannel pipette is recommended).</i> Incubate on a plate shaker (~200 rpm) for 10 to 15 minutes at room temperature.
10.	Add 50 µl of stopping solution to each well and mix thoroughly by gently tapping the plate.
11.	Measure the absorbance at 450 nm in all wells with a microplate reader between 0–20 minutes after addition of the stopping solution.

CALCULATIONS

- Using immunoassay software, choose either a 4-parameter or 5-parameter curve fitting method for calculating results.
- If a sample reads more than 60 ng/ml then dilute the sample (that has undergone the angiotensin-I generation procedure) with Standard A at a dilution of no more than 1:10 and rerun the sample. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.
Note: Samples must be diluted only after they have undergone the angiotensin-I generation procedure; do not dilute any samples before performing the angiotensin-I generation procedure.
- Calculate the plasma renin activity (PRA) in each sample using the following equation:

$$\text{PRA} = \left\{ \frac{[\text{Ang-I (37°C)}] - [\text{Ang-I (0°C)}]}{\text{Time (hrs)}} \right\} \times 1.11$$

Where time (hrs) is the incubation time used during the generation step.

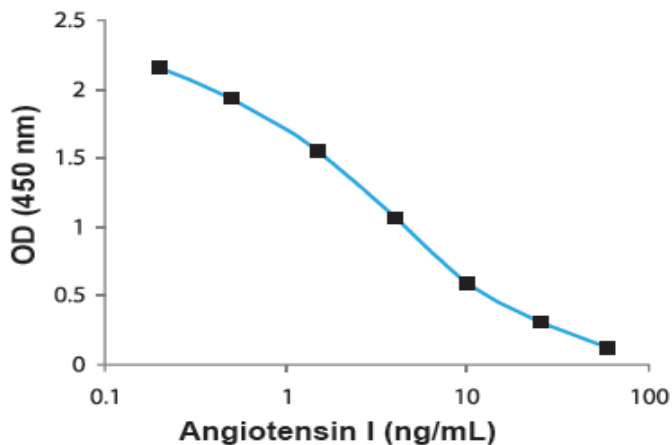
TYPICAL TABULATED DATA

Sample data only. Do not use to calculate results

Standard	Mean OD (450 nm)	Ang-I (ng/ml)
A	2.303	0
B	2.156	0.2
C	1.937	0.5
D	1.552	1.5
E	1.066	4
F	0.591	10
G	0.311	25
H	0.122	60

TYPICAL STANDARD CURVE

Sample curve only, do not use to calculate results.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The limit of detection (LoD) was determined from the analysis of 40 samples of the blank and a low value sample and it was calculated as follows:

$$\text{LoD} = \mu_B + 1.645\sigma_B + 1.645\sigma_S,$$

where σ_B and σ_S are the standard deviation of the blank and low value sample and μ_B is the mean value of the blank.

LoD = 0.14 ng/ml of Angiotensin I

SPECIFICITY (CROSS-REACTIVITY)

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

Antigen	Sequence	% Cross-Reactivity
Angiotensin-I	DRVYIHPFHL	100
Angiotensin 1-9	DRVYIHPFH	0.015
Angiotensin-II	DRVYIHPF	<0.001
Angiotensin-III	RVYIHPF	<0.001
Angiotensin 1-5	DRVYI	<0.001
Renin Substrate human	DRVYIHPFHLVIHN	0.001

RECOVERY

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

Sample	Observed Result	Expected Result	Recovery %
1.Unspiked	0.86	-	-
+0.48	1.43	1.34	107
+1.92	2.82	2.78	101
+5.77	6.47	6.63	98
+11.53	10.58	12.40	85
1.Unspiked	2.84	-	-
+0.48	3.30	3.32	99
+1.92	5.34	4.77	112
+5.77	8.84	8.61	103
+11.53	13.08	14.38	91
1.Unspiked	9.45	-	-
+0.48	9.92	9.93	100
+1.92	11.35	11.37	100
+5.77	13.82	15.22	91
+11.53	17.62	20.99	84

LINEARITY

Three patient plasma samples were diluted with Standard A. The results (in ng/ml) are tabulated below:

Sample	Obs. Result	Exp. Result	Recovery %
1	10.96	-	-
1:2	5.739	5.48	105
1:4	2.718	2.74	99
1:8	1.423	1.37	104
1:16	0.776	0.685	113
2	15.798	-	-
1:2	8.273	7.899	105
1:4	3.934	3.950	100
1:8	1.948	1.975	99
1:16	1.146	0.987	116
3	30.7	-	-
1:2	16.142	15.350	105
1:4	7.477	7.675	97
1:8	3.542	3.838	92
1:16	1.574	1.919	82

INTERFERENCE

Interference testing was performed according to CLSI guideline EP7-A2. Plasma samples with varying levels of angiotensin-I were spiked with potential interfering substances at recommended levels and analyzed. Results were compared to the same plasma samples with no extra substances added to calculate the % interference.

$$\text{Interference (\%)} = \frac{[\text{Ang I}(\text{Spiked sample})] - [\text{AngI}(\text{Native sample})]}{[\text{AngI}(\text{Native sample})]} \times 100$$

Interferent	Added Interferent Concentration	% Interference
Haemoglobin	1 g/l	-3.0
	2 g/l	-3.8
Bilirubin Unconjugated	20 µM (12 mg/l)	0
	500 µM (300 mg/l)	0
Bilirubin Conjugated*	20 µM (16 mg/l)	+3.0
	500 µM (400 mg/l)	+13.5
Haemoglobin + Bilirubin	1 g/l + 20 µM	-0.4
	1 g/l + 500 µM	-0.1
	2 g/l + 20 µM	-3.9
	2 g/l + 500 µM	-12.4
Triglycerides (2C-10 C)	3.7 mM	+4.8
	37 mM	+16.9
Triglycerides (8C-16 C)	3.7 mM	-0.6
	37 mM	+2.2
HSA	40 g/l	-2.2
	60 g/l	-9.6

*Taurobilirubin

INTRA-ASSAY PRECISION

Four samples were assayed 14 times each on the same standard curve. The results (in ng/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	2.3	0.2	8.7
2	3.6	0.2	6.8
3	7.0	0.4	6.3
4	13.3	0.9	7.0

INTER-ASSAY PRECISION

Four samples were assayed in ten different tests. The results (in ng/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	0.48	0.03	7.12
2	0.82	0.04	5.32
3	9.46	0.45	4.81
4	11.70	0.64	5.44

COMPARATIVE STUDIES

The PRA ELISA kit (y) was compared with a competitor's PRA RIA kit (x). The comparison of 73 plasma samples yielded the following linear regression results:

$$y = 0.93x - 0.08, \quad r = 0.97$$

EXPECTED NORMAL VALUES

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values. Data presented here were from samples incubated at pH 6.0 during the generation step (Brossaud and Corcuff, 2009).







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

REFERENCES

1. Brossaud J, Corcuff JB. Pre-Analytical and Analytical Considerations for the Determination of Plasma Renin Activity. *Clin Chim Acta*. 2009; 410(1-2):90-2.
2. Bystrom CE, et al. Plasma Renin Activity by LC-MS/MS: Development of a Prototypical Clinical Assay Reveals a Subpopulation of Human Plasma Samples With Substantial Peptidase Activity. *Clin Chem*. 2010; 56(10):1561-9.
3. Campbell DJ, et al. Activity Assays and Immunoassays for Plasma Renin and Prorenin: Information Provided and Precautions Necessary for Accurate Measurement. *Clin Chem*. 2009; 55(5):867-77.
4. Cartledge S, Lawson N. Aldosterone and Renin Measurements. *Ann Clin Biochem*. 2000; 37(Pt 3):262-78.
5. Derkx FH, et al. Two-step Prorenin-Renin Conversion. Isolation of an Intermediary Form of Activated Prorenin. *J Biol Chem*. 1987; 262(6):2472-7.
6. Hartman D, et al. Direct Renin Assay and Plasma Renin Activity Assay Compared. *Clin Chem*. 2004; 50(11):2159-61.
7. Pimenta E, Calhoun D. Response to "Effective" Plasma Renin Activity: A Derived Measure for Assessing Residual Plasma Renin Activity in Patients Taking Angiotensin- Converting Enzyme Inhibitors or Angiotensin Receptor Blockers. *Hypertension*. 2010; 55:e17.
8. Reudelhuber TL. Prorenin, Renin, and Their Receptor: Moving Targets. *Hypertension*. 2010; 55(5):1071-4.
9. Sealey JE, et al. Plasma Renin Methodology: Inadequate Sensitivity and Accuracy of Direct Renin Assay for Clinical Applications Compared With the Traditional Enzymatic Plasma Renin Activity Assay. *J Hypertens*. 1995; 13(1):27-30.
10. Sealey JE. Plasma Renin Activity and Plasma Prorenin Assays. *Clin Chem*. 1991; 37(10 Pt 2):1811-9.
11. Sealey JE, et al. Plasma Renin and Aldosterone Measurements in Low Renin Hypertensive States. *Trends Endocrinol Metab*. 2005; 16(3):86-91.
12. Ulmer PS, Meikle AW. Sample Requirements for Plasma Renin Activity and Immunoreactive Renin. *Clin Chem*. 2000; 46(9):1442-4.

Please use only the valid version of the instructions for use provided with the kit

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date	LOT	Batch code	IVD	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	CONT	Content	CE	CE labelled
	Caution	REF	Catalogue number		

VERWENDUNGSZWECK

Für die quantitative Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) in Humanplasma durch ein Enzymimmunoassay. Zu *in-vitro*-Diagnosezwecken.

Deutsch

TESTPRINZIP

Dieses Kit misst die PRA und gibt die Ergebnisse als pro Zeiteinheit und Volumen von Humanplasma erzeugte Menge von Angiotensin I (Ang-I) an (ng/ml·h).

Die Blutprobe wird in ein EDTA-enhaltendes Röhrchen entnommen. Das Plasma wird abgetrennt und entweder eingefroren gelagert oder für die sofortige Verwendung auf Raumtemperatur gehalten; die Proben sollten während der Entnahme oder Verarbeitung vor der pH-Einstellung nicht auf Eis gekühlt oder bei Temperaturen zwischen 0 und 10 °C gehalten werden, da dies zu einer Überschätzung der Renin-Aktivität führen könnte. Vor Beginn des Immunoassays werden ein Proteasehemmer und der Bildungspuffer der Plasmaprobe zugesetzt, um Angiotensin-I (Ang-I) im Plasma vor dem Abbau zu schützen. Der pH-Wert der Plasmaprobe sollte nach der Zugabe des mitgelieferten Bildungspuffers etwa 6,0 betragen. Die Plasmaprobe wird in zwei Teile geteilt, und beide werden bei 0–4 °C (im Eisbad) bzw. 37 °C jeweils 90 Minuten lang inkubiert, um die Bildung von Ang I-Plasma-Renin bei 37 °C zu ermöglichen. Gegebenenfalls kann der pH-Wert auf 6,5 bzw. 7,4 eingestellt werden. Die Einstellung des pH-Wertes ist ein kritischer Schritt des Messverfahrens; Ansäuerung des Plasmas auf pH 3,3 oder weniger für längere Zeit mit anschließender Neutralisierung kann irreversible Aktivierung des Renins verursachen (Derckx et al., 1987), während andererseits Inkubation bei einem pH über 8,0 das Renin zerstören kann. Während der Immunoassay-Inkubation ist eine weitere Reihe von Protease-Inhibitoren beteiligt, die Neubildung sowie den Abbau von Ang-I zu kleineren Peptiden hemmen.

Das Immunoassay auf Ang-I ist ein kompetitiver Test, der zwei Inkubationen mit einer gesamten Assay-Inkubationszeit von weniger als zwei Stunden verwendet. Während der ersten Inkubation konkurriert unmarkiertes Ang-I (in Standards, Kontrollen und Plasmaproben) mit biotinyliertem Ang-I um Bindung an den anti-Ang-I-Antikörper. Während der zweiten Inkubation bindet das markierte Streptavidin-HRP-Konjugat an das immobilisierte Ang-I-Biotin. Die Wasch- und Abgießschritte entfernen ungebundenes Material. Das kolorimetrische HRP-Substrat wird zugesetzt, und nach Stoppen der Farbentwicklungsreaktion wird die Extinktion (OD) in einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Die Absorptionswerte sind umgekehrt proportional zu der Konzentration von Ang-I in der Probe. Eine Reihe von Standards wird verwendet, um eine Standardkurve zu erzeugen, von der die Konzentrationen von Ang-I in den Proben und Kontrollen direkt abgelesen werden können.

KLINISCHE ANWENDUNGEN

Die Messung der PRA ist wichtig für die klinische Beurteilung von Patienten mit Bluthochdruck. Insbesondere kann die Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität bei der Diagnostik des primären Hyperaldosteronismus (5–13% der Bluthochdruckfälle) und bei Therapie und Management von anderen Formen von Bluthochdruck helfen. Die PRA ist gegenüber der Bestimmung von Renin-Konzentration aus mehreren Gründen ein genaueres Maß für primären Hyperaldosteronismus (PHA):

1. Die PRA ist die Geschwindigkeit der Ang-I-Bildung durch die enzymatische Wirkung von Renin auf sein Substrat Angiotensinogen; daher hängt die PRA nicht nur von der Reninkonzentration, sondern auch von der Konzentration von Angiotensinogen ab, die bei Messung der Reninkonzentration ignoriert wird.
2. Messung der Reninkonzentration stellt Empfindlichkeit bei niedrigen Reninspiegeln nicht sicher, während die Empfindlichkeit der PRA-Messung durch Erhöhung der Inkubationszeit im Bildungsschritt verbessert werden kann (Sealey et al., 2005).
3. Durch Bindung eines Inhibitors ans aktive Zentrum von Renin wird die PRA inhibiert, während die Anwesenheit des Inhibitors die Erkennung von Renin durch derzeit verfügbare Immunoassays nicht beeinflusst, die Gesamt-Reninkonzentration daher nicht immer mit der Plasma-Renin-Aktivität korreliert (Campbell et al., 2009).

Renin setzt Angiotensin-I aus Angiotensinogen frei. Angiotensin-I wird im Lungenkreislauf durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) weitgehend in Angiotensin-II umgewandelt. Angiotensin-II erhöht den Blutdruck durch direkte arteriöle Vasokonstriktion, Förderung der Natriumretention und Stimulierung der Sekretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Aldosteron übt auch einen erhaltenden Effekt auf den Natriumhaushalt aus und steigert den arteriellen Druck. Genaue Messung der Konzentration von zirkulierendem Angiotensin-II ist aufgrund seiner Instabilität in Blutproben eine Herausforderung. Aldosteron-Konzentrationen können mit Hilfe eines Immunoassay-Kits (Aldosterone ELISA, MS E-5200) bestimmt werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

1. Anwender sollten für den erfolgreichen Einsatz dieses Kits das Protokoll gründlich verstanden haben. Zuverlässige Leistung wird nur durch strenge und sorgfältige Einhaltung der Anleitung erreicht.
2. Ang-I ist derzeit in keinen externen QK-Regelungen erfasst. Daher wird jedem Labor empfohlen, seine eigenen internen QK-Materialien und Verfahren zur Beurteilung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu erstellen.
3. Wenn Wasser zur Verdünnung oder Rekonstitution zu verwenden ist, ist demineralisiertes oder destilliertes Wasser einzusetzen.
4. Alle Testreagenzien und Proben sollten Raumtemperatur haben und vor Gebrauch vorsichtig, aber gründlich durchmischt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Plasmaproben.

5. Für jeden Lauf muss eine Standardkurve erstellt werden. Die Kit-Kontrollen sollten in jeden Lauf eingeschlossen werden und innerhalb etablierter Vertrauensgrenzen liegen.
6. Verschiedene Chargen von Kit-Komponenten sind innerhalb eines Tests nicht zu mischen, und keine Komponente darf nach dem Verfallsdatum auf dem Etikett verwendet werden.
7. Die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich und sollte immer in dunklen Flaschen vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt gelagert werden.
8. Um Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, verwenden Sie zur Entnahme aller Reagenzien, Proben, Standards und Kontrollen jeweils eine neue Einweg-Pipettenspitze.
9. Unsachgemäße Verfahrenstechniken, unpräzises Pipettieren, unvollständiges Waschen und unsachgemäße Lagerung der Reagenzien können in Frage kommen, wenn die Messwerte für die Kontrollen nicht in den etablierten Bereichen liegen. Die Leistung dieses Assays wird erheblich durch die korrekte Ausführung des Waschschriffs bestimmt!

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Dieses Kit ist speziell für die Bestimmung der Renin-Aktivität/Ang-I-Bildung in EDTA-Plasma entworfen und validiert. Andere Materialquellen sind vor der Anwendung zu validieren.
2. Der Ang-I-Spiegel hängt von mehreren Faktoren ab, einschließlich von Reninaktivität, Renin-Substrat-Konzentration, Plasma-pH, Temperatur und Auswahl der Inhibitoren. Daher eignen sich nur sorgfältig vorbereitete Plasmaproben für diesen Test.
Bakterielle Kontamination, wiederholte Einfrier- und Auftau-Zyklen und Verdünnung der Plasmaproben können das Testergebnis beeinflussen.
3. Die Interpretation der Ergebnisse sollte die Bedingungen berücksichtigen, die die Renin-Sekretion beeinflussen können, wie Natrium- und Kaliumzufuhr, Körperhaltung, Medikamente wie Diuretika, Clonidin, β -Blocker, Östrogenprogestogene und periphere Vasodilatoren.
4. Verwenden Sie nicht grob hämolytisches, lipämisches oder ikterisches Plasma oder irgendeine Probe, die nicht ordnungsgemäß entsprechend der Anweisung behandelt wurde.
5. Die mit diesem Kit erhaltenen Ergebnisse sollten nicht als alleinige Grundlage für die klinische Diagnostik verwendet werden. Zum Beispiel hat das Auftreten heterophiler Antikörper bei Patienten, die regelmäßig Kontakt mit Tieren oder Tierprodukten haben, ein Störpotential für immunologische Tests. Daher sollte die klinische Diagnose alle Aspekte des Hintergrunds eines Patienten einschließlich der Häufigkeit seiner Exposition gegenüber Tierprodukten berücksichtigen, wenn falsche Ergebnisse vermutet werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

POTENZIELL INFEKTIÖSES MATERIAL

Alle Reagenzien dieses Kits sollten als potentielle Biogefährdungen betrachtet und mit den gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie jede Blutprobe gehandhabt werden. Humanplasma-Proben sollten gemäß der guten Laborpraxis und so, als ob sie infektiös wären, gehandhabt werden.

CHEMISCHE GEFAHREN

Kontakt mit Reagenzien, die PMSF und Wasserstoffperoxid enthalten, vermeiden. Bei Kontakt mit einem dieser Reagenzien oder anderen im Kit: mit viel Wasser abwaschen.

BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND INSTRUMENTE

1. Dinatrium-EDTA (2 mg/ml Blut)-Probennahmeröhrchen
2. Ein- und Mehrkanalpipetten und Einwegspitzen.
3. Destilliertes oder demineralisiertes Wasser.
4. Einweg-Teströhrchen (Glas oder Polypropylen).
5. Plattenschüttler.
6. Mikrotiterplatten-Photometer mit 450-nm-Filter.
7. 37-°C-Inkubator.
8. Eisbad.
9. 95% Ethanol.

MITGELIEFERTE REAGENZIEN

1. AA E-0030 WASH-CONC 10x Waschpufferkonzentrat - erfordert eine Vorbereitung X10

Inhalt: Zwei Flaschen Puffer mit nichtionischem Detergens und quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 2×50 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:10 in destilliertem oder demineralisiertem Wasser verdünnen. Wenn die gesamte Platte verwendet werden soll, 50 ml Waschpufferkonzentrat mit 450 ml Wasser verdünnen.

2. MS E-5655 SUBSTRATE **TMB Substrat** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine Flasche Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem DMF- und DMSO-freien Puffer.
 Volumen: 32 ml/Flasche
 Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

3. MS E-5680 STOP-SOLN **Stopplösung** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine Flasche mit 1M Schwefelsäure.
 Volumen: 12 ml/Flasche
 Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

Mögliche Gefahren:



H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.
 H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

4. Standards und Kontrollen – Gebrauchsfertig.

Nachfolgend sind ungefähre Konzentrationen angegeben; die genauen Konzentrationen finden sich auf den Etiketten der Fläschchen:

Kat.-Nr.	Zeichen	Standard	Konzentration*	Volumen/Fläschchen
MS E-5601	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	2,0 ml
MS E-5602	STANDARD B	Standard B	0,2 ng/ml	0,7 ml
MS E-5603	STANDARD C	Standard C	0,5 ng/ml	0,7 ml
MS E-5604	STANDARD D	Standard D	1,5 ng/ml	0,7 ml
MS E-5605	STANDARD E	Standard E	4 ng/ml	0,7 ml
MS E-5606	STANDARD F	Standard F	10 ng/ml	0,7 ml
MS E-5607	STANDARD G	Standard G	25 ng/ml	0,7 ml
MS E-5608	STANDARD H	Standard H	60 ng/ml	0,7 ml
MS E-5651	CONTROL 1	Kontrolle 1	Siehe Fläschchenetiketten für akzeptablen Bereich!	0,7 ml
MS E-5652	CONTROL 2	Kontrolle 2		0,7 ml

* Richtwert – die genauen Konzentrationen finden sich auf den Fläschchenetiketten.

Inhalt: Synthetisches Angiotensin-I-Peptid in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel. Die Standards sind gegen das WHO-Standardreagenz NIBSC Code 86/536 geeicht.

Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C

Stabilität: 12 Monate im ungeöffneten Fläschchen oder wie auf dem Etikett angegeben.

5. MS E-5613 ASSAY-BUFF **Assay-Puffer** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine Flasche mit proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
 Volumen: 40 ml/Flasche
 Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

6. MS E-5631 IM 96 **Mikrowell-Platte, beschichtet mit Kaninchen-anti-Ang-I-Antikörpern** – gebrauchsfertig.

Inhalt: Zwei vorbeschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatten in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel.
 Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

7. MS E-5640 CONJUGATE-CONC 100x **Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat-Konzentrat** - erfordert eine Vorbereitung X100

- Inhalt: Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
- Volumen: 0,5 ml/Fläschchen
- Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
- Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.
- Vorbereitung: Das Konjugatkonzentrat ist vor der Verwendung 1:100 mit Assay-Puffer zu verdünnen. Die Arbeitslösung des Konjugats ist 8 Stunden lang stabil; ungebrauchte Lösung ist danach zu verwerfen.

8. MS E-5610 BIOTIN-AB **Angiotensin-I-Biotinkonjugat** – Gebrauchsfertig.

- Inhalt: Eine Flasche mit Puffer, Protease-Inhibitoren, Angiotensin-I-Biotin-Konjugat und quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
- Volumen: 30 ml/Flasche
- Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
- Stabilität: 12 Monate im ungeöffneten Fläschchen oder wie auf dem Etikett angegeben.

9. MS E-5614 PMSF **PMSF – Vorbereitung erforderlich**

- Inhalt: Eine Flasche mit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF).
- Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
- Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.
- Vorbereitung: Rekonstitution durch Zugabe von 0,5 ml 95% Ethanol zu der Flasche und zweiminütiges Vortexen, um das PMSF vollständig aufzulösen. Nach dem ersten Gebrauch kühlen und zum erneuten Auflösen des Inhalts wieder vortexen. Die Flasche sollte nicht unnötig offen stehen.

10. MS E-5515 BUFF **Bildungspuffer** – Gebrauchsfertig.

- Inhalt: Puffer und nicht-toxische Antibiotika.
- Volumen: 5 ml/Flasche
- Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
- Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

PROBENNAHME UND -LAGERUNG

Pro Doppelbestimmung sind mindestens 0,5 ml Plasma erforderlich. Richtige Probennahme ist wesentlich für die genaue Bestimmung des Angiotensin-I. *In-vitro*-Generierung und Abbau von Angiotensin-I können durch die folgenden empfohlenen Entnahmeverfahren minimiert werden:

1. Probennahme von 2 ml Blut in EDTA-Blutprobenröhrchen oder -Spritze.
2. Blut 15 Minuten lang bei 5000 UPM bei Raumtemperatur zentrifugieren.
3. Übertragen der Plasmaprobe bei Raumtemperatur in ein Reagenzgefäß.
4. Wenn die Proben jetzt zu testen sind, mit dem Angiotensin-I-Bildungsverfahren fortfahren, ansonsten Proben sofort bei -20 °C oder kälter einfrieren. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben vermeiden.

ANGIOTENSIN-I-BILDUNGSVERFAHREN

1. Bei Verwendung einer frisch abgenommenen Plasmaprobe mit Schritt 2 fortfahren. Bei Verwendung gefrorener Plasmaproben sind diese wie folgt aufzutauen: Gefrorene Plasmaproben durch Platzieren der Probenröhrchen in raumtemperiertem Wasser rasch auf Raumtemperatur bringen.
2. Übertragen von 0,5 ml der Plasmaprobe in ein Reagenzgefäß.
3. 5 µl der PMSF-Lösung zu 0,5 ml der Plasmaprobe zugeben (1:100-Verhältnis). Das Röhrchen zum gründlichen Mischen vortexen.
4. Dann 50 µl Bildungspuffer der behandelten Probe aus Schritt 3 zusetzen (Verhältnis 1:10). Das Röhrchen zum gründlichen Mischen erneut vortexen.
5. Die behandelte Probe aus Schritt 4 durch die Übertragung von jeweils 0,25 ml in zwei Reaktionsröhrchen in zwei gleiche Aliquots teilen. Das eine Aliquot 90 Minuten oder länger (180 Minuten nicht überschreiten) bei 37 °C inkubieren, das andere im Eisbad (0 °C) platzieren. Achten Sie darauf, die Inkubationszeit der Aliquots aufzuzeichnen, da sie für die Berechnungen verwendet wird.
6. Am Ende der Inkubationszeit das 37 °C-Aliquot zur schnellen Abkühlung 5 Minuten in das Eisbad stellen.
7. Beide Aliquots zum Erwärmen auf Raumtemperatur 5–10 Minuten (nicht mehr als 10 Minuten) in ein Wasserbad mit Raumtemperatur stellen.

TESTVERFAHREN

1.	Lassen Sie die Komponenten des Kits Raumtemperatur erreichen. Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen und montieren sie im dem Plattenrahmen.
2.	Je 50 µl jeder Standard, Kontrolle und behandelten Plasmaprobe (sowohl 37-°C- als auch 0-°C- Aliquots) jeweils zweifach in entsprechend markierte Wells pipettieren.
3.	Je 100 µl des Angiotensin-I-Biotin-Konjugats in jeden Well pipettieren (Verwendung einer Mehrkanalpipette wird empfohlen).
4.	60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler (≈ 200 UPM) inkubieren .
5.	5x mit je 300 µl verdünnten Waschpuffers die Wells auswaschen. Nach dem Waschen die Platte fest auf saugfähigem Papier ausschlagen, um restliche Flüssigkeit zu entfernen (Verwendung eines automatischen Streifenwaschgeräts wird dringend empfohlen). Die Leistung dieses Assays wird erheblich durch die korrekte Ausführung des Waschschriffs bestimmt!
6.	Je 150 µl des Streptavidin-HRP-Konjugats in jeden Well pipettieren (Verwendung einer Mehrkanalpipette wird empfohlen).
7.	30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler (≈ 200 UPM) inkubieren .
8.	5x wie in Schritt 5 die Wells waschen .
9.	Je 150 µl des TMB-Substrats in jeden Well pipettieren (Verwendung einer Mehrkanalpipette wird empfohlen). 10 – 15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler (≈ 200 UPM) inkubieren .
10.	50 µl Stopplösung jedem Well zusetzen und durch vorsichtiges Klopfen gegen die Platte mischen..
11.	Extinktion in allen Wells 0–20 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bei 450 nm mit einem Mikroplattenleser messen.

BERECHNUNGEN

- In der Immunoassay-Software wählen Sie entweder ein 4-Parameter- oder ein 5-Parameter-Kurvenanpassungsverfahren zur Berechnung der Ergebnisse.
- Zeigt eine Probe mehr als 60 ng/ml, dann verdünnen Sie die Probe (die bereits dem Angiotensin-I-Bildungsverfahren unterzogen wurde) mit Standard A auf nicht mehr als 1:10 und wiederholen Sie die Messung. Das erhaltene Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

Anmerkung: Proben dürfen erst verdünnt werden, nachdem sie dem Angiotensin-I-Bindungsverfahren unterzogen wurden; keinesfalls Proben vor dem Angiotensin-I-Bildungsverfahren verdünnen.

- Berechnung der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) in jeder Probe unter Verwendung der folgenden Gleichung:

$$PRA = \left\{ \frac{[\text{Ang-I (37°C)}] - [\text{Ang-I (0°C)}]}{\text{Zeit (Stunden)}} \right\} \times 1,11$$

wobei die Zeit (Stunden) die Inkubationszeit im Bildungsschritt ist

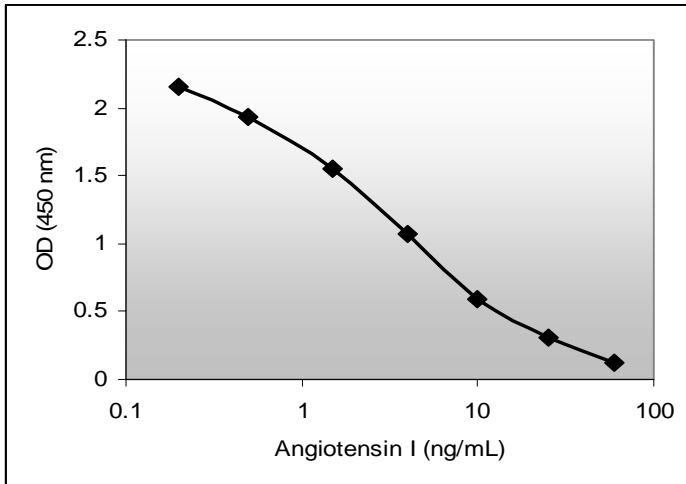
TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN

Nur Beispieldaten. Nicht zur Ergebnisberechnung verwenden

Standard	MW OD (450 nm)	Ang-I (ng/ml)
A	2,303	0
B	2,156	0,2
C	1,937	0,5
D	1,552	1,5
E	1,066	4
F	0,591	10
G	0,311	25
H	0,122	60

TYPISCHE STANDARDKURVE

Nur Beispielkurve, **nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.



LEISTUNGSMERKMALE

EMPFINDLICHKEIT

Die Nachweisgrenze (LOD) wurde aus der Analyse von 40 Proben des Leerwerts und einer Probe mit niedrigem Wert bestimmt und wie folgt errechnet:

$$\text{LOD} = \mu_B + 1,645 \sigma_B + 1,645 \sigma_S,$$

wobei σ_B und σ_S die Standardabweichungen des Leerwerts und der Probe mit niedrigem Wert sind und μ_B der Mittelwert des Leerwerts ist.

$$\text{LOD} = 0,14 \text{ ng/ml Angiotensin I}$$

SPEZIFITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)

Die folgenden Verbindungen wurden nach der Abraham-Methode auf Kreuzreaktivität getestet, wobei 100% die Kreuzreaktivität von Angiotensin-I war:

Antigen	Sequenz	% Kreuzreaktivität
Angiotensin-I	DRVYIHPFHL	100
Angiotensin 1-9	DRVYIHPFH	0,015
Angiotensin-II	DRVYIHPF	<0,001
Angiotensin-III	RVYIHPF	<0,001
Angiotensin 1-5	DRVYI	<0,001
Menschliches Renin-Substrat	DRVYIHPFHLVIHN	0,001

WIEDERFINDUNG

Dotierte Proben wurden durch Zugabe von definierten Mengen von Angiotensin-I zu drei Patientenplasmaproben hergestellt. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Beobachtetes Ergebnis	Erwartetes Ergebnis	Wiederfindung (%)
1. Undotiert	0,86	-	-
+0,48	1,43	1,34	107
+1,92	2,82	2,78	101
+5,77	6,47	6,63	98
+11,53	10,58	12,40	85
1. Undotiert	2,84	-	-
+0,48	3,30	3,32	99
+1,92	5,34	4,77	112
+5,77	8,84	8,61	103
+11,53	13,08	14,38	91
1. Undotiert	9,45	-	-
+0,48	9,92	9,93	100
+1,92	11,35	11,37	100
+5,77	13,82	15,22	91
+11,53	17,62	20,99	84

LINEARITÄT

Drei Patientenplasmaproben wurden mit Standard A verdünnt. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind nachfolgend tabellarisch dargestellt:

Probe	Beob. Resultat	Erw. Resultat	Wiederfindung (%)
1	10,96	-	-
1:2	5,739	5,48	105
1:4	2,718	2,74	99
1:8	1,423	1,37	104
1:16	0,776	0,685	113
2	15,798	-	-
1:2	8,273	7,899	105
1:4	3,934	3,950	100
1:8	1,948	1,975	99
1:16	1,146	0,987	116
3	30,7	-	-
1:2	16,142	15,350	105
1:4	7,477	7,675	97
1:8	3,542	3,838	92
1:16	1,574	1,919	82

STÖRUNGEN

Interferenztests wurden gemäß CLSI-Richtlinie EP7-A2 durchgeführt. Plasmaproben mit unterschiedlichen Angiotensin-I-Gehalten wurden mit potenziell störenden Substanzen in empfohlenen Konzentrationen versetzt und analysiert. Die Ergebnisse wurden mit den gleichen Plasmaproben ohne Zugabe zusätzlicher Stoffe verglichen, um die Interferenz in % zu berechnen.

$$\text{Störung (\%)} = \frac{[\text{Ang I(Dotierte Probe)}] - [\text{Ang I(Native Probe)}]}{[\text{Ang I(Native Probe)}]} \times 100$$

Störsubstanz	Hinzugefügte Konzentration der Störsubstanz	% Interferenz
Hämoglobin	1 g/l	-3,0
	2 g/l	-3,8
Bilirubin unkonjugiert	20 µM (12 mg/l)	0
	500 µM (300 mg/l)	0
Bilirubin konjugiert *	20 µM (16 mg/l)	+3,0
	500 µM (400 mg/l)	+13,5
Hämoglobin + Bilirubin	1 g/l + 20 µM	-0,4
	1 g/l + 500 µM	-0,1
	2 g/l + 20 µM	-3,9
	2 g/l + 500 µM	-12,4
Triglyceride (2C-10C)	3,7 mM	+4,8
	37 mM	+16,9
Triglyceride (8C-16C)	3,7 mM	-0,6
	37 mM	+2,2
HSA	40 g/l	-2,2
	60 g/l	-9,6

* Taurobilirubin

REPRODUZIERBARKEIT INNERHALB EINES ASSAYS

Vier Proben wurden jeweils 14-mal mit der gleichen Standardkurve getestet. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Mittelwert	StAbw	VK%
1	2,3	0,2	8,7
2	3,6	0,2	6,8
3	7,0	0,4	6,3
4	13,3	0,9	7,0

REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN ASSAYS

Vier Proben wurden in zehn verschiedenen Tests untersucht. Die Ergebnisse (in ng/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Mittelwert	StAbw	VK%
1	0,48	0,03	7,12
2	0,82	0,04	5,32
3	9,46	0,45	4,81
4	11,70	0,64	5,44

VERGLEICHSTUDIEN

Das PRA-ELISA-Kit (y) wurde mit einem PRA-RIA-Kit (x) eines Konkurrenten verglichen. Der Vergleich von 73 Plasmaproben ergab die folgenden linearen Regressionsergebnisse:

$$y = 0,93x - 0,08; \quad r = 0,97$$

ERWARTETE STANDARDWERTE

Wie bei allen klinischen Tests sollte jedes Labor Daten sammeln und seinen eigenen Bereich erwarteter Standardwerte erstellen. Die hier präsentierten Daten stammen von während des Bildungsschritts bei pH 6,0 inkubierten Proben (Brossaud und Corcuff, 2009).







N	PRA Mittelwert (ng/ml·h)	PRA Bereich (10.–90. Perzentil) (ng/ml·h)
533	0,75	0,06 - 4,69

LITERATUR

1. Brossaud J, Corcuff JB. Pre-Analytical and Analytical Considerations for the Determination of Plasma Renin Activity. *Clin Chim Acta*. 2009; 410(1-2):90-2.
2. Bystrom CE, et al. Plasma Renin Activity by LC-MS/MS: Development of a Prototypical Clinical Assay Reveals a Subpopulation of Human Plasma Samples With Substantial Peptidase Activity. *Clin Chem*. 2010; 56(10):1561-9.
3. Campbell DJ, et al. Activity Assays and Immunoassays for Plasma Renin and Prorenin: Information Provided and Precautions Necessary for Accurate Measurement. *Clin Chem*. 2009; 55(5):867-77.
4. Cartledge S, Lawson N. Aldosterone and Renin Measurements. *Ann Clin Biochem*. 2000; 37(Pt 3):262-78.
5. Derkx FH, et al. Two-step Prorenin-Renin Conversion. Isolation of an Intermediary Form of Activated Prorenin. *J Biol Chem*. 1987; 262(6):2472-7.
6. Hartman D, et al. Direct Renin Assay and Plasma Renin Activity Assay Compared. *Clin Chem*. 2004; 50(11):2159-61.
7. Pimenta E, Calhoun D. Response to "Effective" Plasma Renin Activity: A Derived Measure for Assessing Residual Plasma Renin Activity in Patients Taking Angiotensin- Converting Enzyme Inhibitors or Angiotensin Receptor Blockers. *Hypertension*. 2010; 55:e17.
8. Reudelhuber TL. Prorenin, Renin, and Their Receptor: Moving Targets. *Hypertension*. 2010; 55(5):1071-4.
9. Sealey JE, et al. Plasma Renin Methodology: Inadequate Sensitivity and Accuracy of Direct Renin Assay for Clinical Applications Compared With the Traditional Enzymatic Plasma Renin Activity Assay. *J Hypertens*. 1995; 13(1):27-30.
10. Sealey JE. Plasma Renin Activity and Plasma Prorenin Assays. *Clin Chem*. 1991; 37(10 Pt 2):1811-9.
11. Sealey JE, et al. Plasma Renin and Aldosterone Measurements in Low Renin Hypertensive States. *Trends Endocrinol Metab*. 2005; 16(3):86-91.
12. Ulmer PS, Meikle AW. Sample Requirements for Plasma Renin Activity and Immunoreactive Renin. *Clin Chem*. 2000; 46(9):1442-4.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer		