

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Plasma Renin Activity (PRA) ELISA



DEMSE5600



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

Table Contents / Inhaltsverzeichnis

1. INTENDED PURPOSE & USE.....	3
2. LIMITATIONS RELATED TO INTENDED PURPOSE & USE	3
3. SUPPLEMENTAL INFORMATION	3
4. PRINCIPLE OF THE TEST	3
5. PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS	4
6. SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS	5
7. SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND PRE-TREATMENT.....	5
8. REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED.....	6
9. REAGENTS PROVIDED	6
10. RECOMMENDED ASSAY LAYOUT	9
11. ASSAY PROCEDURE.....	9
12. CALCULATIONS	10
13. QUALITY CONTROL.....	10
14. TYPICAL DATA	10
15. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	11
16. REFERENCE RANGES	13
17. LITERATURE	13
18. CHANGE HISTORY	14
1. ZWECKBESTIMMUNG	15
2. EINSCHRÄNKUNGEN IN BEZUG AUF DIE ZWECKBESTIMMUNG	15
3. ZUSÄTZLICHE INFORMATIONEN.....	15
4. TESTPRINZIP	16
5. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE	16
6. SICHERHEITS- UND WARNHINWEISE	17
7. PROBENENTNAHME, -LAGERUNG UND -VORBEREITUNG.....	18
8. BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND GERÄTE.....	18
9. MITGELIEFERTE REAGENZIEN	19
10. EMPFOHLENES ASSAY-LAYOUT.....	21
11. TESTVERFAHREN	22
12. BERECHNUNGEN	23
13. QUALITÄTSKONTROLLE.....	23
14. TYPISCHE DATEN	23
15. LEISTUNGSMERKMALE	24
16. REFERENZBEREICHE.....	26
17. LITERATUR.....	27
18. ÄNDERUNGSHISTORIE	28
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	28

1. INTENDED PURPOSE & USE

For the quantitative measurement Plasma Renin Activity (PRA) in human EDTA plasma by an ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

This kit is intended for professional use only and is for laboratory use only. For *in vitro* diagnostic use only. Intended to be used manually but may be adaptable to open automated analyzers. The user is responsible for validating the performance of this kit with any automated analyzers.

2. LIMITATIONS RELATED TO INTENDED PURPOSE & USE

1. This test is not intended to be used for screening purposes.
2. This test is not intended for home testing or self-testing.
3. The kit is calibrated for the determination of renin activity in human plasma. The kit is not calibrated for the determination of renin activity in other specimens of human or animal origin.
4. The results obtained with this kit shall never be used as the sole basis for a clinical diagnosis and for therapeutic decisions.
5. Although common interfering substances have been evaluated with this test, other substances that have not been evaluated such as drugs and the occurrence of heterophilic antibodies in individuals regularly exposed to animals or animal products have the potential of causing interferences.
6. The angiotensin-I level depends on multiple factors, including renin activity, renin substrate concentration, 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.
7. The interpretation of the results should recognize that some conditions can affect renin secretion, such as sodium and potassium intake, posture, medications like diuretics, clonidine, beta-blockers, and peripheral vasodilators.

3. SUPPLEMENTAL INFORMATION

Plasma renin activity is an important diagnostic test for individualized therapy for resistant hypertension. It has been reported that measuring plasma renin activity significantly improved blood pressure control in patients with severe resistant hypertension [1]. A randomized trial in the USA reported a reduction of medication required to achieve control using plasma renin activity to guide therapy [2].

PRA is based on renin releasing angiotensin-I from angiotensinogen. Angiotensin-I is transformed to angiotensin-II largely in pulmonary circulation by the 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. Hence, the determination of plasma renin activity can aid in the diagnosis of primary hyperaldosteronism (5 – 13% of hypertensive cases) and assist in the therapy and management of other forms of hypertension.

PRA and renin concentration assays provide different information about plasma renin. First, PRA is the expression of the rate of angiotensin-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 overlooked in the renin concentration assays. Second, plasma renin concentration assays do 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. Third, PRA is influenced by inhibitors, whereas the presence of inhibitors does not affect the recognition of renin by currently available immunoassays, therefore total renin concentration does not always correlate with plasma renin activity. Those differences should be understood by clinicians and clinical chemists for the correct interpretation of the assays [17].

4. PRINCIPLE OF THE TEST

Prior to testing plasma samples with the PRA ELISA, a specimen pre-treatment step is required. First, a protease inhibitor (PMSF) is added to the sample to prevent the degradation of angiotensin-I. Next, the generation buffer is added to bring the pH of the sample to approximately 6.0. The plasma sample is then pipetted into two aliquots. One aliquot is incubated at 0 °C (ice bath) and the other is incubated at 37 °C. Angiotensin-I will be generated by plasma renin in the fraction incubated at 37 °C.

The PRA ELISA is a competitive immunoassay. In the first incubation step, competition occurs between angiotensin-I present in standards, controls, specimen samples and an angiotensin-I-biotin conjugate (biotin conjugate) for a limited number of anti-angiotensin-I antibody binding sites on the microplate wells. During this incubation, protease inhibitors are present to prevent the degradation of angiotensin-I into smaller peptides.

In the second incubation step, streptavidin-HRP conjugate is added, which binds specifically to any bound biotin conjugate. Unbound streptavidin HRP conjugate is removed by a washing step. Next, the

TMB substrate (enzyme substrate) is added which reacts with HRP to form a blue coloured product that is inversely proportional to the amount of angiotensin-I present. The enzymatic reaction is terminated by the addition of the stopping solution, converting the blue colour to a yellow colour. The absorbance is measured on a microplate reader at 450 nm. A set of standards is used to plot a standard curve from which the concentration of angiotensin-I in specimen samples and controls can be directly read.

The plasma renin activity concentration in the plasma sample is calculated from the angiotensin-I concentration in the 0 °C and 37 °C aliquots and the generation time used. The plasma renin activity results are expressed in terms of the mass of angiotensin-I generated per volume of human plasma per unit of time (ng/ml/h).

5. PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. This kit is for use by trained laboratory personnel (professional use only). For laboratory *in vitro* use only.
2. Practice good laboratory practices when handling kit reagents and specimens. This includes:
 - Do not pipette by mouth.
 - Do not smoke, drink, or eat in areas where specimens or kit reagents are handled.
 - Wear protective clothing and disposable gloves.
 - Wash hands thoroughly after performing the test.
 - Avoid contact with eyes; use safety glasses; in case of contact with eyes, flush eyes with water immediately and contact a doctor.
3. 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.
4. Do not use the kit beyond the expiry date stated on the label.
5. If the kit reagents are visibly damaged, do not use the test kit.
6. Do not use kit components from different kit lots within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
7. All kit reagents and specimens must be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of specimens.
8. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
9. Immediately after use, each individual component of the kit must be returned to the recommended storage temperature stated on the label.
10. A standard curve must be established for every run.
11. It is recommended to all customers to prepare their own control materials or plasma pools which should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
12. The controls (included in kit) must be included in every run and their results must fall within the ranges stated in the quality control certificate; a failed control result might indicate improper procedural techniques or pipetting, incomplete washing, or improper reagent storage.
13. When dispensing the substrate and stopping solutions, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
14. The TMB Substrate is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.
15. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored plasma.
16. Collected specimen samples must be immediately processed (centrifuged) and the plasma must be either stored frozen or kept at room temperature for immediate use. Samples should not be chilled on ice or stored at temperatures between 0 – 10 °C during collection or processing as this could lead to overestimation of renin activity.
17. Samples or controls containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, they may lead to false results.
18. If sample values are above the angiotensin-I measuring range of the ELISA kit, they may be further diluted and retested. Only standard A may be used to dilute plasma samples. The use of any other reagent may lead to false results. Samples must be diluted only after they have undergone the angiotensin-I generation procedure.
19. Avoid microbial contamination of reagents.
20. To prevent the contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, standard, and control.
21. To prevent the contamination of reagents, do not pour reagents back into the original containers.
22. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to local and/or national regulations.
23. Consumables used with the kit that are potentially biohazardous (e.g., pipette tips, bottles or containers containing human materials) must be handled according to biosafety practices to

- minimize the risk of infection and disposed of according to local and/or national regulations relating to biohazardous waste.
24. This kit contains 1 M sulfuric acid in the stopping solution component. Do not combine acid with waste material containing sodium azide or sodium hypochlorite.
 25. The use of safety glasses, and disposable plastic, is strongly recommended when manipulating biohazardous or bio-contaminated solutions.
 26. Proper calibration of the equipment used with the test, such as the pipettes and absorbance microplate reader, is required.
 27. If a microplate shaker is required for the assay procedure, the type and speed of shaker required is stated in the REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED section. Both the type and speed of shaker used can influence the optical densities and test results. If a different type of shaker and/or speed is used, the user is responsible for validating the performance of the kit.
 28. Do not reuse the microplate wells, they are for SINGLE USE only.
 29. To avoid condensation within the microplate wells in humid environments, do not open the pouch containing the microplate until it has reached room temperature.
 30. Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

6. SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

6.1 BIOHAZARDS

The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions applied to blood specimens. All human specimens should be considered a potential biohazard and handled as if capable of transmitting infections and in accordance with good laboratory practices.

6.2 CHEMICAL HAZARDS

Avoid direct contact with any of the kit reagents. Specifically avoid contact with the TMB Substrate (contains tetramethylbenzidine), Stopping Solution (contains sulfuric acid) and PMSF. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water and refer to SDS for additional information.

7. SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND PRE-TREATMENT

7.1 Specimen Collection & Storage

A minimum of 0.5 ml of EDTA plasma is required per duplicate determination. Proper sample collection is essential for the accurate determination of angiotensin-I. The *in vitro* generation and degradation of angiotensin-I can be minimized by following the recommended collection and processing procedure as stated below.

1. Collect at least 2 ml of venous blood into an appropriately labelled EDTA blood collection tube.
2. Centrifuge the sample at room temperature for 15 minutes at 2000 g.
3. Transfer the plasma sample into a new labelled storage tube.
4. If samples are to be assayed immediately, proceed to the Specimen Pre-Treatment section, otherwise store at room temperature for up to 6 hours or freeze at -20 °C or lower for up to 30 days. Avoid more than two freeze-thaw cycles.

Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

7.2 Specimen Pre-Treatment & Storage

Prior to being tested, all processed plasma specimens must be pre-treated according to the Angiotensin-I generation procedure as stated below. At the end of this procedure, there will be two pre-treated aliquots per plasma sample, a 0 °C aliquot and a 37 °C aliquot.

Angiotensin-I Generation Procedure

1. If a freshly processed plasma sample is being used, proceed to step 2. If a frozen plasma sample is being used, thaw the sample quickly by placing the tube in a room temperature water bath.
2. Pipette 0.5 ml of the plasma sample into a new sample tube.
3. Pipette 5 µl of the PMSF solution (see section 9. *Reagents Provided*, 7. *PMSF*, for preparation instructions) into the tube containing the plasma sample from step 2 (1:100 ratio). Vortex the tube to mix thoroughly.
4. Pipette 50 µl of the generation buffer into the tube containing the treated sample from step 3 (1:10 ratio). Vortex the tube to mix thoroughly.

5. Pipette 0.25 ml of the sample from step 4 into a new sample tube. There will now be two aliquots of the treated plasma sample. Label one as **0 °C** and the other as **37 °C**.
6. Simultaneously place the 37 °C labelled tube into a 37 °C incubator and place the 0 °C labelled tube into an ice bath (0 – 4 °C) for 90 minutes or longer (do not exceed 180 minutes). Be sure to record the incubation time used, as this is required to calculate the plasma renin activity.
7. At the end of the incubation period place the 37 °C tube in the ice bath for 5 minutes to cool it down quickly.
8. If the generated samples will be tested immediately, bring both sample tubes (0 °C and 37 °C) to room temperature by placing them in a water bath with room temperature water for 5 – 10 minutes. The samples are now ready for testing.
9. If the generated samples will be tested at a later time, immediately freeze both sample tubes (0 °C and 37 °C) at -20 °C or lower for up to 3 months. Prior to use, bring the frozen generated samples to room temperature by placing them in a water bath with room temperature water for 5 – 10 minutes. The samples are now ready for testing.



Do not pre-treat the standards and kit controls; they are provided in a ready to use format.

8. REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Calibrated single-channel pipette to dispense 5 µl, 50 µl, 250 µl and 500 µl.
2. Calibrated multi-channel pipettes to dispense 50 µl, 100 µl and 150 µl.
3. Calibrated multi-channel pipettes to dispense 300 µl (if washing manually).
4. Automatic microplate washer (recommended).
5. Microplate shaker:
 - a. Orbital shaker (3 mm diameter) set to 600 rpm or
 - b. Reciprocating shaker (1.5" stroke length) set to 180 oscillations/minute.
6. Disposable pipette tips.
7. Distilled or deionized water.
8. Calibrated absorbance microplate reader with a 450 nm filter and an upper OD limit of 3.0 or greater.
9. Polypropylene tubes for sample processing and pre-treatment (e.g., polypropylene microcentrifuge tubes).
10. A 37 °C incubator.
11. A 0 – 4 °C ice bath.
12. Ethanol (94% or higher concentration).
13. Water bath.

9. REAGENTS PROVIDED

1. **MS E-5631** 96 **Microplate – Ready to Use**
 Contents: Two anti-angiotensin-I polyclonal antibody-coated 96-well (12x8) microplates, each in a resealable pouch with desiccant.
 Storage: 2 – 8 °C
 Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
 After Opening: Stable for ten weeks.
2. **MS E-5610** BIOTIN-AB **Biotin Conjugate – Ready to Use**
 Contents: One bottle containing Angiotensin-I-Biotin conjugate in a protein-based buffer with protease inhibitors and a non-mercury preservative.
 Volume: 30 ml/bottle
 Storage: 2 – 8 °C
 Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
 After Opening: Stable for ten weeks.
3. **MS E-5640** CONJUGATE-CONC 100x **Streptavidin-HRP Conjugate Concentrate – Concentrated; Requires Preparation**
 Contents: One bottle containing Streptavidin-Horse Radish Peroxidase (HRP) conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
 Volume: 0.5 ml/bottle
 Storage: 2 – 8 °C
 Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.

After Opening: Stable for ten weeks.
 Following Preparation: The HRP conjugate working solution is stable for 8 hours at room temperature following preparation.

Preparation of Streptavidin-HRP Conjugate Working Solution: **X100 Dilute 1:100 Before Use**
 Dilute 1:100 in assay buffer before use (e.g., 20 µl of conjugate concentrate in 1.98 ml of assay buffer). If one whole microplate is to be used, dilute 200 µl of conjugate concentrate in 19.8 ml of assay buffer. Discard any that is left over.

4. Standards and Controls – Ready to Use

Cat. no.	Symbol	Standard	Concentration*	Volume/bottle
MS E-5601	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	2.0 ml
MS E-5602	STANDARD B	Standard B	0.2 ng/ml	1.0 ml
MS E-5603	STANDARD C	Standard C	0.5 ng/ml	1.0 ml
MS E-5604	STANDARD D	Standard D	1.5 ng/ml	1.0 ml
MS E-5605	STANDARD E	Standard E	4 ng/ml	1.0 ml
MS E-5606	STANDARD F	Standard F	10 ng/ml	1.0 ml
MS E-5607	STANDARD G	Standard G	25 ng/ml	1.0 ml
MS E-5608	STANDARD H	Standard H	60 ng/ml	1.0 ml
MS E-5651	CONTROL 1	Control 1	Refer to the QC certificate for the target values and acceptable ranges.	1.0 ml
MS E-5652	CONTROL 2	Control 2		1.0 ml

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

Contents: Eight bottles of standard containing specified angiotensin-I concentrations. Protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with defined quantities of angiotensin-I.
 The standards are calibrated against the World Health Organization reference reagent NIBSC code 86/536.
 Two bottles of control containing different angiotensin-I concentrations. Protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with defined quantities of angiotensin-I.

Storage: 2 – 8 °C

Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
 After Opening: Stable for ten weeks.

5. **MS E-5613** **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer – Ready to Use**

Contents: One bottle containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 40 ml/bottle

Storage: 2 – 8 °C

Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
 After Opening: Stable for ten weeks.

6. **MS E-5616** **BUFF** **Generation Buffer – Ready to Use**

Contents: One bottle containing a buffer and a non-toxic antibiotic.

Volume: 5 ml/bottle

Storage: 2 – 8 °C

Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
 After Opening: Stable for ten weeks.




Hazards identification:



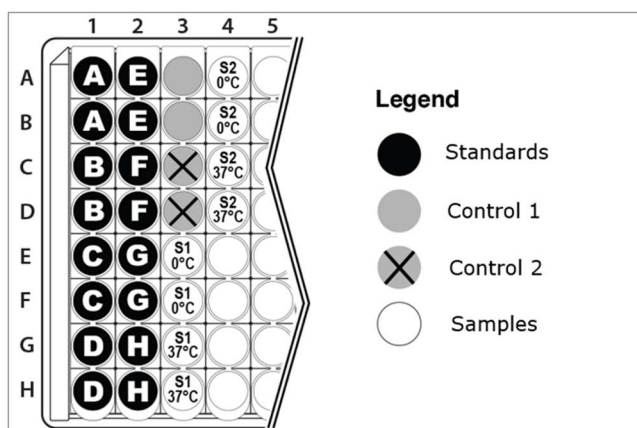
H332 Harmful if inhaled.

H317 May cause an allergic skin reaction.

H334 May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.

- 7. MS E-5614** PMSF **Phenylmethylsulfonyl fluoride – Requires Preparation**
- Contents: Two tubes containing phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF).
Quantity: 2 x tubes
Storage: 2 – 8 °C
Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
Following Preparation: Stable for 2 months at 2 – 8 °C.
Preparation of PMSF: Reconstitute by adding 0.5 ml of ethanol (94% or higher concentration) to the tube. Cap the tube and vortex for two minutes to completely dissolve.
Working Solution: Refrigerate after first use, vortex again to re-dissolve contents before use. Do not keep the bottle open unnecessarily.
- Hazards identification:  
H301 Toxic if swallowed.
H314 Causes severe skin burns and eye damage.
H318 Causes serious eye damage.
- 8. 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/bottle
Storage: 2 – 8 °C
Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
After Opening: Stable for ten weeks.
- 9. MS E-5680** STOP-SOLN **Stopping Solution – Ready to Use**
- Contents: One bottle containing 1 M sulfuric acid.
Volume: 12 ml/bottle
Storage: 2 – 8 °C
Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
After Opening: Stable for ten weeks.
- Hazards identification: 
H315 Causes skin irritation.
H319 Causes serious eye irritation.
- 10. AA E-0030** WASH-CONC 10x **Wash Buffer Concentrate – Concentrated; Requires Preparation**
- Contents: Two bottles containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.
Volume: 50 ml/bottle (Quantity: 2 bottles)
Storage: 2 – 8 °C
Stability: Unopened: Stable until the expiry date printed on the label.
After Opening: Stable for ten weeks.
Following Preparation: The wash buffer working solution is stable for 2 weeks following preparation, assuming Good Laboratory Practices are adhered to. To prevent microbial growth, prepare the wash buffer working solution in a clean container and store under refrigerated conditions (2 – 8 °C) when not in use.
- Preparation of Wash Buffer Working Solution: **X10 Dilute 1:10 Before Use**
Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If one whole microplate is to be used, dilute 50 ml of the wash buffer concentrate in 450 ml of distilled or deionized water.

10. RECOMMENDED ASSAY LAYOUT



11. ASSAY PROCEDURE

Specimen Pre-Treatment:



All specimens that will be tested must be pre-treated before being tested (see section 7.2. *Specimen Pre-Treatment & Storage*). Do not pre-treat the standards and kit controls as they are provided ready to use.

All kit components, controls and specimen samples must reach room temperature prior to use. Standards, controls, and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1. After all kit components have reached room temperature, **mix** gently by inversion.
2. **Prepare** the Streptavidin-HRP Conjugate Working Solution and Wash Buffer Working Solution (See section 9. *Reagents Provided* section, 3. *Streptavidin-HRP Conjugate Concentrate* and 11. *Wash Buffer Concentrate*).
3. **Prepare** all specimen samples that will be tested. Refer to section 7.2. *Specimen Pre-Treatment & Storage*. For each plasma sample, both the 0 °C and 37 °C pre-treated samples must be run together within the same test.
4. **Plan** the microplate wells to be used for standards, controls, and samples. See section 10. *Recommended Assay Layout*.
Remove the strips from the microplate frame that will not be used and place them in the bag with desiccant. Reseal the bag with the unused strips and return it to the refrigerator.
5. **Pipette 50 µl** of each standard, control, and pre-treated specimen sample (both 0 °C and 37 °C aliquots) into assigned wells.
6. **Pipette 100 µl** of the Biotin Conjugate into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended).
7. **Incubate** the microplate on a microplate shaker** for **60 minutes** at room temperature.
8. **Wash** the microplate wells with an automatic microplate washer (preferred) or manually as stated below.

Automatic: Using an automatic microplate washer, perform a **5-cycle** wash using **300 µl/well** of Wash Buffer Working Solution (5 x 300 µl). One cycle consists of aspirating all wells then filling each well with 300 µl of Wash Buffer Working Solution. After the final wash cycle, aspirate all wells and then tap the microplate firmly against absorbent paper to remove any residual liquid.

Manually: For manual washing, perform a **5-cycle** wash using **300 µl/well** of Wash Buffer Working Solution (5 x 300 µl). One cycle consists of aspirating all wells by briskly emptying the contents of the wells over a waster container, then pipetting 300 µl of Wash Buffer Working Solution into each well using a multi-channel pipette. After the final wash cycle, aspirate all wells by briskly emptying the contents over a waste container and then tap the microplate firmly against absorbent paper to remove any residual liquid.
9. **Pipette 150 µl** of the Streptavidin-HRP Conjugate Working Solution into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended).
10. **Incubate** the microplate on a microplate shaker** for **30 minutes** at room temperature.

11. Wash the microplate wells again as stated in step 8.
12. Pipette 150 µl of TMB Substrate into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended).
13. Incubate the microplate on a microplate shaker** for 15 minutes at room temperature.
14. Pipette 50 µl of Stopping Solution into each well (the use of a multi-channel pipette is recommended) in the same order and speed as was used for addition of the TMB Substrate. Gently tap the microplate frame to mix the contents of the wells.
15. Measure the optical density (absorbance) in the microplate wells using an absorbance microplate reader set to 450 nm, within 20 minutes after addition of the Stopping Solution.

** See section 8. *Reagents And Equipment Needed But Not Provided* for microplate shaker options.

12. CALCULATIONS

1. Calculate the mean optical density for each standard, control and specimen sample duplicate.
2. Use a 4-parameter or 5-parameter curve fit with immunoassay software to generate a standard curve.
3. The immunoassay software will calculate the concentrations of the controls and specimen samples using the mean optical density values and the standard curve.
4. Using the obtained concentrations of Angiotensin-I (Ang-I) in the 37 °C and 0 °C aliquots and the generation time used, calculate the plasma renin activity (PRA) in each sample using the following equation:

$$PRA = \left(\frac{[Ang-I (37^{\circ}C)] - [Ang-I(0^{\circ}C)]}{Generation Time (h)} \right) \times 1.11$$

5. 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 must 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.

13. QUALITY CONTROL

When assessing the validity of the test results, the following criteria should be evaluated:

1. The standard A mean optical density meets the acceptable range as stated in the QC Certificate.
2. The standard with the highest concentration meets the % binding acceptable range as stated in the QC Certificate. % Binding = (OD of standard/OD of standard A) x 100.
3. The values obtained for the kit controls are within the acceptable ranges as stated in the QC certificate.
4. The results of any external controls that were used meet the acceptable ranges.

14. TYPICAL DATA

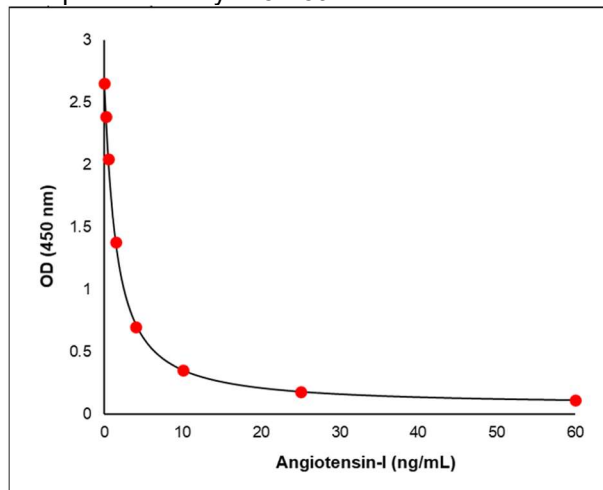
14.1 TYPICAL TABULATED DATA

Sample data only. **Do not** use to calculate results.

Standard	Mean OD (450 nm)	% Binding	Angiotensin-I (ng/ml)
A	2.654	100	0
B	2.388	90	0.2
C	2.044	77	0.5
D	1.383	52	1.5
E	0.701	26	4
F	0.353	13	10
G	0.182	7	25
H	0.114	4	60
Unknown	1.634	–	1.0

14.2 TYPICAL STANDARD CURVE

Sample curve only. **Do not** use to calculate results.

**15. PERFORMANCE CHARACTERISTICS****15.1 SENSITIVITY**

The analytical sensitivity study was performed according to the CLSI EP17-A2 guideline. The Limit of Background (LoB), Limit of Detection (LoD) and Limit of Quantitation (LoQ) for both Angiotensin-I and PRA are summarized in the table below:

Parameter	Angiotensin-I (ng/ml)	PRA (ng/ml/h)
LoB	0.093	0.024
LoD	0.166	0.059
LoQ	0.166	0.090

15.2 SPECIFICITY (CROSS-REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with angiotensin-I cross-reacting at 100%.

Compound	% Cross-Reactivity
Angiotensin I	100%
Angiotensin II	< 0.001%
Angiotensin III	< 0.001%
Angiotensin 1 – 5	< 0.001%
Angiotensin 1 – 7	< 0.001%
Angiotensin 1 – 9	0.122%
Renin Substrate	0.015%

15.3 INTERFERENCES

An interference study was performed according to the CLSI EP07-Ed3 guideline. Three human plasma samples were spiked with potentially interfering substances. No significant interference was detected up to the concentrations shown in the table below.

Interferent	Test Concentration
Acetaminophen	30 µg/ml
Acetylcysteine	15 mg/dl
Acetylsalicylic Acid	3 mg/dl
Ampicillin Na	7.5 mg/dl
Bilirubin Conjugated	20 mg/dl
Bilirubin Unconjugated	40 mg/dl
Biotin	2.4 µg/ml
Captopril	1000 ng/ml
Captopril disulfide	10 µg/ml
Cathepsin B	100 ng/ml
Cathepsin D	10 ng/ml
Cefoxitin Na	300 mg/dl

Cyclosporine	0.18 mg/dl
Doxycycline HCl	1.8 mg/dl
Enalaprilat dihydrate	200 ng/ml
Furosemide (Lasix)	50 µg/ml
Haemoglobin	1.25 g/l
HAMA	1000 ng/ml
Heparin	3300 U/l
Human Serum Albumin	52 g/l
Ibuprofen	21.9 mg/dl
Insulin	150 µIU/ml
Levodopa	0.75 mg/dl
Methyldopa	2.25 mg/dl
Metronidazole	12.3 mg/dl
Nicardipine (Loxen)	200 ng/ml
Phenylbutazone	32.1 mg/dl
Rheumatoid Factor (RF)	200 IU/ml
Rifampicin	4.8 mg/dl
Theophylline	25 µg/ml
Triglycerides	1000 mg/dl

15.4 PRECISION

The precision studies were performed according to the CLSI EP05-A3 guideline.

Repeatability

Five EDTA plasma samples covering the range of the assay (from 0.17 to 52.1 ng/ml of angiotensin-I) were run by one operator with one kit lot over 20 days, two runs per day and two replicate measurements per run, producing a total of 80 measurements per sample (20x2x2 design for each sample). The position of the samples in the microplate was randomly changed from one day to another. The PRA generation times spanned 90 – 180 minutes. Data were analyzed with a two-way nested ANOVA and are summarized in the table below.

Sample	Mean, PRA, ng/ml/hr	Repeatability		Within Laboratory	
		SD, PRA, ng/ml/hr	CV	SD, PRA, ng/ml/hr	CV
1	0.322	0.0367	11.4%	0.0615	19.1%
2	4.568	0.2060	4.5%	0.3565	7.8%
3	1.672	0.0768	4.6%	0.1275	7.6%
4	7.924	0.5005	6.3%	0.8042	10.1%
5	22.886	1.7496	7.6%	3.0223	13.2%

Reproducibility

Reproducibility was evaluated across three locations using an experimental design model 3x5x5 (3 locations x 5 testing days x 5 replicates per sample per day). The study included five plasma samples covering the kit assay range and the two kit controls. The generation time changed from day to day covering the full range suggested in this IFU (90 – 180 minutes). The position of the kit controls and samples in the microplate was randomized from one day to another. Data was analyzed with a two-way nested ANOVA and are summarized in the table below.

Kit Controls	Mean	Repeatability		Within Location		Reproducibility	
	ng/ml	SD, ng/ml	CV%	SD, ng/ml	CV%	SD, ng/ml	CV%
1	0.966	0.051	5.2	0.081	8.4	0.140	14.5
2	9.850	0.370	3.8	0.701	7.1	0.820	8.3
PRA	ng/ml/h	SD, ng/ml/h	CV%	SD, ng/ml/h	CV%	SD, ng/ml/h	CV%
S1	0.285	0.049	17.2	0.053	18.7	0.065	22.9
S2	4.416	0.247	5.6	0.596	13.5	0.596	13.5
S3	1.431	0.101	7.1	0.147	10.3	0.256	17.9
S4	7.656	0.490	6.4	0.827	10.8	0.910	11.9
S5	22.763	2.379	10.5	3.520	15.5	3.985	17.5

15.5 LINEARITY

The linearity study was according to the CLSI EP06-Ed2 guideline using three human EDTA plasma samples.

Each plasma sample was pre-treated according to the Angiotensin-I Generation Procedure to produce a 0 °C and 37 °C aliquot. Each aliquot was diluted using standard A at several equidistant concentration levels and up to a 1:10 dilution. Samples were tested in quadruplicate, and the results compared to the predicted concentrations. The statistical analysis shows that the assay is sufficiently linear up to a 1:10 dilution when using standard A as the diluent. The results (in ng/ml/h) are tabulated below:

Sample	Observed Result	Expected Result	Recovery %
1	33.7		–
1:2	17.9	16.9	105.9
1:4	8.33	8.43	98.8
1:10	3.24	3.37	96.1
2	7.11	–	–
1:2	3.33	3.56	93.5
1:4	1.59	1.78	89.3
1:10	0.60	0.71	84.5
3	1.66		–
1:2	0.68	0.83	81.9
1:4	0.33	0.42	78.6
1:10	0.13	0.17	76.5

15.6 RECOVERY

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

Sample	Observed Result	Expected Result	Recovery %
1 Unspiked	1.09	–	–
+ 1	2.16	2.09	103.3
+ 15	15.3	16.1	95.0
+ 50	41.8	51.1	81.8
2 Unspiked	1.72	–	–
+ 1	2.70	2.72	99.3
+ 15	16.8	16.7	100.6
+ 50	54.1	51.7	104.6
3 Unspiked	1.01	–	–
+ 1	1.76	2.01	87.6
+ 15	12.7	16.0	79.4
+ 50	41.7	51.0	81.8

16. REFERENCE RANGES

As for all clinical assays, each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values. Data from Literature reference [18].

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

17. LITERATURE

- Spence JD. (1999) Physiologic tailoring of therapy for resistant hypertension: 20 years' experience with stimulated renin profiling. *Am J Hypertension*. 12(11 Pt 1):1077-83.
- Egan BM, Basile JN, Rehman SU, Davis PB, Grob CH, III, Riehle JF, et al. (2009) Plasma Renin test-guided drug treatment algorithm for correcting patients with treated but uncontrolled hypertension: a randomized controlled trial. *Am J Hypertens*. 22(7):792-801.
- Tan ACITL, Kloppenborg PWC, Benraad TJ. (1989) Influence of Age, Posture and Intra-Individual Variation on Plasma Levels of Atrial Natriuretic Peptide. *Annals of Clinical Biochemistry*. 26(6):481-486.

3. Tiu, S. C., Choi, C. H., Shek, C. C., Ng, Y. W., Chan, F. K., Ng, C. M., & Kong, A. P. (2005). The use of aldosterone-renin ratio as a diagnostic test for primary hyperaldosteronism and its test characteristics under different conditions of blood sampling. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(1), 72–78.
4. Sealey JE, Gerten-Banes J, Laragh JH (1972), The renin system: Variations in man measured by radioimmunoassay or bioassay *Kidney International* 1:240-253.
5. Sealey, J. E., Gordon, R. D., & Mantero, F. (2005). Plasma renin and aldosterone measurements in low renin hypertensive states. *Trends in endocrinology and metabolism*. TEM, 16(3), 86–91.
6. J. Brossaud and J.B. Corcuff, (2009) Pre-analytical and Analytical Considerations for the Determination of Plasma Renin Activity, *Clinica Chimica Acta* 410:90–92.
7. F. K. Suessenbach, B. B. Burckhardt. Levels of angiotensin peptides in healthy and cardiovascular/renal - diseased paediatric population—an investigative review. *Heart Failure Reviews* (2019) 24:709–723
<https://doi.org/10.1007/s10741-019-09797-y>
8. Guoqing Yao, Wenjing Li, Wenzhao Liu, et al. (2021) The Level and Significance of Circulating Angiotensin-III in Patients with Coronary Atherosclerosis. *Hindawi Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 1704762, <https://doi.org/10.1155/2021/1704762>
9. Valle Martins AL, da Silva FA, Bolais-Ramos L, et al. (2021) Increased circulating levels of angiotensin-(1–7) in severely ill COVID-19 patients. *ERJ Open Res* 7: 00114-2021 [DOI: 10.1183/23120541.00114-2021].
10. Clare A. McKinney, Caroline FATTAH, Christopher M. Loughrey et al. (2014) Angiotensin-(1–7) and angiotensin-(1–9): function in cardiac and vascular remodelling. *Clinical Science*. 126, 815–827 (Printed in Great Britain) doi: 10.1042/CS20130436
11. Stirati G, de Martino A, Mene P, et al. (1983) Plasma renin activity: effect of temperature during blood processing. *J Clin Chem Clin Biochem* 529-31
12. Ruth Lapworth, Sally E Green and Frances Short. (1990) In vitro stability of assayed renin activity in plasma and whole blood. *Ann Clin Biochem* 27: 78-79
13. Zoltan Locsei, Karoly Racz, Attila Patocs et al. (2009). Influence of sampling and storage conditions on plasma renin activity and plasma renin concentration. *Clinica Chimica Acta* 402 203–205
14. Morganti, A; Lonati, C; Turolo, L (2010) Brief Cryoactivation Markedly Affects Plasma Renin Activity and Direct Renin Measurement in Low Renin Samples: PP.24.473, *Journal of Hypertension*: 28 p e388 doi: 10.1097/01.hjh.0000379399.50039.3c.
15. Sealey JE. (1991) Plasma renin activity and plasma prorenin assays. *Clin Chem*. 37(10 Pt 2):1811-9. PMID: 1914195.
16. Campbell, D. J., Nussberger, J., Stowasser, M., Danser, A. H., Morganti, A., Frandsen, E., & Ménard, J. (2009). Activity assays and immunoassays for plasma Renin and prorenin: information provided and precautions necessary for accurate measurement. *Clinical chemistry*, 55(5), 867–877.
17. 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.

18. CHANGE HISTORY

Previous Version:	6.0	New Version:	7.0
Changes:	Design change of product and new IFU format; all information in IFU was revised.		
Previous Version:	7.0	New Version:	8.0
Changes:	7.2 Specimen Pre-Treatment & Storage Angiotensin-I Generation Procedure 8. Added: If the generated samples will be tested immediately, ...The samples are now ready for testing. 9. Added: If the generated samples will be tested at a later time, ... Added information on how to bring the frozen generated samples to room temperature prior to testing. 9. Reagents Provided 9. Stopping Solution The hazard pictogram GHS05 has been replaced by the hazard pictogram GHS07.		

1. ZWECKBESTIMMUNG

Für die quantitative Bestimmung der Plasmareninaktivität (PRA) in humanem EDTA-Plasma durch einen ELISA (Enzymgebundener Immunosorbent-Assay).

Dieses Kit ist nur für den professionellen Gebrauch bestimmt und darf nur im Labor verwendet werden. Nur für *In-vitro*-Diagnosezwecke geeignet. Es ist für die manuelle Anwendung vorgesehen, kann aber auch an offene automatische Analysegeräte angepasst werden. Der Benutzer ist für die Validierung der Leistung dieses Kits mit automatisierten Analysegeräten verantwortlich.

2. EINSCHRÄNKUNGEN IN BEZUG AUF DIE ZWECKBESTIMMUNG

1. Dieser Test ist nicht für Screeningzwecke bestimmt.
2. Dieser Test ist nicht für Heimtests oder Selbsttests vorgesehen.
3. Der Test ist für die Bestimmung der Reninaktivität in Humanplasma kalibriert. Der Test ist nicht für die Bestimmung der Reninaktivität in anderen Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs kalibriert.
4. Die mit diesem Kit erzielten Ergebnisse dürfen niemals als alleinige Grundlage für eine klinische Diagnose und für therapeutische Entscheidungen verwendet werden.
5. Obwohl gängige Störsubstanzen mit diesem Test evaluiert wurden, können andere Substanzen, die nicht evaluiert wurden, wie z.B. Medikamente und das Auftreten von heterophilen Antikörpern bei Personen, die regelmäßig mit Tieren oder tierischen Produkten in Kontakt kommen, Störungen verursachen.
6. Der Angiotensin-I-Spiegel hängt von mehreren Faktoren ab, darunter die Reninaktivität, die Reninsubstratkonzentration, der pH-Wert des Plasmas, die Temperatur und die Auswahl der Inhibitoren. Daher sind nur sorgfältig aufbereitete Plasmaproben für diesen Test geeignet. Bakterielle Verunreinigungen, wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen und die Verdünnung von Plasmaproben können das Testergebnis beeinflussen.
7. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass einige Bedingungen die Reninsekretion beeinflussen können, z.B. die Natrium- und Kaliumzufuhr, die Körperhaltung, Medikamente wie Diuretika, Clonidin, Betablocker und periphere Vasodilatoren.

3. ZUSÄTZLICHE INFORMATIONEN

Die Plasmareninaktivität ist ein wichtiger diagnostischer Test für die individualisierte Therapie der resistenten Hypertonie. Es wurde berichtet, dass die Messung der Plasmareninaktivität die Blutdruckkontrolle bei Patienten mit schwerer resistenter Hypertonie deutlich verbessert [1]. In einer randomisierten Studie in den USA wurde berichtet, dass die zur Blutdruckkontrolle erforderliche Medikamentenmenge reduziert werden konnte, wenn die Plasmaereninaktivität zur Steuerung der Therapie verwendet wurde [2].

Die PRA basiert auf Renin, das Angiotensin-I aus Angiotensinogen freisetzt. Angiotensin-I wird hauptsächlich im Lungenkreislauf durch das Angiotensinkonvertierende Enzym (ACE) in Angiotensin-II umgewandelt. Angiotensin-II erhöht den Blutdruck durch direkte arterioläre Vasokonstriktion, fördert die Natriumretention und stimuliert die Sekretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Aldosteron wirkt auch auf die Wiederherstellung des Natriumgleichgewichts und die Erhöhung des arteriellen Blutdrucks. Daher kann die Bestimmung der Plasmareninaktivität bei der Diagnose des primären Hyperaldosteronismus (5 – 13% der Fälle von Bluthochdruck) und bei der Therapie und Behandlung anderer Formen des Bluthochdrucks hilfreich sein.

PRA- und Reninkonzentrationstests liefern unterschiedliche Informationen über das Plasmarenin. Erstens ist die PRA Ausdruck der Rate der Angiotensin-I-Bildung durch die enzymatische Wirkung von Renin auf sein Substrat, das Angiotensinogen. Daher hängt die PRA nicht nur von der Reninkonzentration ab, sondern auch von der Angiotensinogenkonzentration, die bei den Reninkonzentrationstests nicht berücksichtigt wird. Zweitens ist die Sensitivität von Plasmareninkonzentrationstests bei niedrigen Reninwerten nicht gewährleistet, während die Sensitivität des PRA-Tests durch eine Verlängerung der Inkubationszeit während des Generierungsschritts erhöht werden kann. Drittens wird die PRA durch Inhibitoren beeinflusst, während das Vorhandensein von Inhibitoren die Erkennung von Renin durch die derzeit verfügbaren Immunoassays nicht beeinträchtigt, so dass die Gesamtenreninkonzentration nicht immer mit der Plasmareninaktivität korreliert. Diese Unterschiede sollten von Klinikern und klinischen Chemikern verstanden werden, um eine korrekte Interpretation der Assays zu ermöglichen [17].

4. TESTPRINZIP

Vor der Untersuchung von Plasmaproben mit dem PRA-ELISA ist ein Probenvorbehandlungsschritt erforderlich. Zunächst wird der Probe ein Proteaseinhibitor (PMSF) zugesetzt, um den Abbau von Angiotensin-I zu verhindern. Anschließend wird der Generationspuffer hinzugefügt, um den pH-Wert der Probe auf etwa 6,0 zu bringen. Die Plasmaprobe wird dann in zwei Aliquots pipettiert. Ein Aliquot wird bei 0 °C (Eisbad) und das andere bei 37 °C inkubiert. In der bei 37 °C inkubierten Fraktion wird Angiotensin-I durch Plasmarenin gebildet.

Der PRA-ELISA ist ein kompetitiver Immunoassay. Im ersten Inkubationsschritt konkurrieren Angiotensin-I, das in Standards, Kontrollen, Proben und einem Angiotensin-I-Biotinkonjugat (Biotinkonjugat) vorhanden ist, um eine begrenzte Anzahl von Anti-Angiotensin-I-Antikörperbindungsstellen auf den Wells der Mikrotiterplatte. Während dieser Inkubation sind Proteaseinhibitoren vorhanden, um den Abbau von Angiotensin-I in kleinere Peptide zu verhindern.

Im zweiten Inkubationsschritt wird Streptavidin-HRP-Konjugat hinzugefügt, das spezifisch an gebundenes Biotinkonjugat bindet. Ungebundenes Streptavidin-HRP-Konjugat wird durch einen Waschschritt entfernt. Anschließend wird das TMB-Substrat (Enzymsubstrat) zugegeben, das mit HRP reagiert und ein blau gefärbtes Produkt bildet, das umgekehrt proportional zur Menge des vorhandenen Angiotensin-I ist. Die enzymatische Reaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet, wodurch die blaue Farbe in eine gelbe Farbe umgewandelt wird. Die Absorption wird mit einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 450 nm gemessen. Anhand einer Reihe von Standards wird eine Standardkurve erstellt, aus der die Konzentration von Angiotensin-I in den Proben und Kontrollen direkt abgelesen werden kann.

Die Konzentration der Plasmareninaktivität in der Plasmaprobe wird aus der Angiotensin-I-Konzentration in den 0 °C- und 37 °C-Aliquots und der verwendeten Generationszeit berechnet. Die Ergebnisse der Plasmareninaktivität werden als Masse an Angiotensin-I ausgedrückt, die pro Volumen an Humanplasma und pro Zeiteinheit erzeugt wird (ng/ml/h).

5. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

1. Dieses Kit ist für den Gebrauch durch geschultes Laborpersonal bestimmt (nur für den professionellen Gebrauch). Nur für den *In-vitro*-Gebrauch im Labor.
2. Beim Umgang mit den Reagenzien und Proben des Kits ist die gute Laborpraxis zu beachten. Dies beinhaltet:
 - Nicht mit dem Mund pipettieren.
 - In Bereichen, in denen mit Proben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, trinken oder essen.
 - Schutzkleidung und Einweghandschuhe tragen.
 - Nach der Durchführung des Tests gründlich die Hände waschen.
 - Kontakt mit den Augen vermeiden; Schutzbrille tragen; bei Augenkontakt die Augen sofort mit Wasser ausspülen und einen Arzt aufsuchen.
3. Für die erfolgreiche Verwendung dieses Kits sollten die Benutzer dieses Protokoll genau verstehen. Zuverlässige Ergebnisse werden nur bei strikter und sorgfältiger Befolgung der Anweisungen erzielt.
4. Das Kit nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfalldatum verwenden.
5. Wenn die Reagenzien des Kits sichtbar beschädigt sind, darf das Testkit nicht verwendet werden.
6. Innerhalb eines Tests keine Kitkomponenten aus verschiedenen Kitchargen verwenden und keine Komponenten nach Ablauf des auf dem Etikett angegebenen Verfalldatums verwenden.
7. Alle Kitreagenzien und Proben müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben ist zu vermeiden.
8. Wenn die Verwendung von Wasser für die Verdünnung oder Rekonstitution vorgeschrieben ist, ist deionisiertes oder destilliertes Wasser zu verwenden.
9. Unmittelbar nach dem Gebrauch muss jeder einzelne Bestandteil des Kits wieder bei der auf dem Etikett angegebenen empfohlenen Lagertemperatur gelagert werden.
10. Für jeden Lauf muss eine Standardkurve erstellt werden.
11. Es wird allen Kunden empfohlen, ihre eigenen Kontrollmaterialien oder Plasmapools herzustellen, die bei jedem Durchlauf in einer hohen und einer niedrigen Konzentration enthalten sein sollten, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu beurteilen.
12. Die Kontrollen (im Kit enthalten) müssen bei jedem Lauf mitgeführt werden und ihre Ergebnisse müssen innerhalb der im Qualitätskontrollzertifikat angegebenen Bereiche liegen; ein fehlerhaftes Kontrollergebnis könnte auf unsachgemäße Verfahrenstechniken oder Pipettierung, unvollständiges Waschen oder unsachgemäße Reagenzienlagerung hinweisen.
13. Beim Dispensieren der Substrat- und Stopplösungen dürfen keine Pipetten verwendet werden, in denen diese Flüssigkeiten mit Metallteilen in Berührung kommen.

14. Das TMB-Substrat ist lichtempfindlich und sollte bei ordnungsgemäßer Lagerung farblos bleiben. Eine Instabilität oder Kontamination kann durch die Entwicklung einer Blaufärbung angezeigt werden; in diesem Fall sollte es nicht verwendet werden.
15. Verwenden Sie kein stark hämolysiertes, stark lipämisches, ikterisches oder unsachgemäß gelagertes Plasma.
16. Entnommene Proben müssen sofort verarbeitet (zentrifugiert) werden und das Plasma muss entweder gefroren gelagert oder bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, damit es sofort verwendet werden kann. Die Proben sollten während der Entnahme oder Verarbeitung nicht auf Eis gekühlt oder bei Temperaturen zwischen 0 und 10 °C gelagert werden, da dies zu einer zu hohen Reninaktivität führen könnte.
17. Proben oder Kontrollen, die Azid oder Thimerosal enthalten, sind mit diesem Kit nicht kompatibel, da sie zu falschen Ergebnissen führen können.
18. Wenn die Probenwerte über dem Angiotensin-I-Messbereich des ELISA-Kits liegen, können sie weiter verdünnt und erneut getestet werden. Zur Verdünnung der Plasmaproben darf nur Standard A verwendet werden. Die Verwendung eines anderen Reagenzes kann zu falschen Ergebnissen führen. Die Proben dürfen erst verdünnt werden, nachdem sie das Verfahren zur Generierung von Angiotensin-I durchlaufen haben.
19. Eine mikrobielle Verunreinigung der Reagenzien ist zu vermeiden.
20. Um eine Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, ist für jedes Reagenz, jede Probe, jeden Standard und jede Kontrolle eine neue Einwegpipettenspitze zu verwenden.
21. Um eine Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, schütten Sie die Reagenzien nicht in die Originalbehälter zurück.
22. Die Reagenzien des Kits sind als gefährlicher Abfall zu betrachten und gemäß den örtlichen und/oder nationalen Vorschriften zu entsorgen.
23. Mit dem Kit verwendete Verbrauchsmaterialien, die potenziell biologisch gefährlich sind (z.B. Pipettenspitzen, Flaschen oder Behälter, die menschliches Material enthalten), müssen nach den Grundsätzen der biologischen Sicherheit gehandhabt werden, um das Infektionsrisiko zu minimieren und gemäß den örtlichen und/oder nationalen Vorschriften für biologisch gefährlichen Abfall entsorgt werden.
24. Dieses Kit enthält 1 M Schwefelsäure in der Stopplösungskomponente. Die Säure darf nicht mit Abfallmaterial gemischt werden, das Natriumazid oder Natriumhypochlorit enthält.
25. Es wird dringend empfohlen, beim Umgang mit biologisch gefährlichen oder biokontaminierten Lösungen eine Schutzbrille und Einwegplastik zu verwenden.
26. Eine ordnungsgemäße Kalibrierung der für den Test verwendeten Geräte, wie z.B. der Pipetten und des Absorptionsmikrotiterplattenreaders, ist erforderlich.
27. Wird für das Testverfahren ein Mikrotiterplattenschüttler benötigt, so sind die Art und die Geschwindigkeit des Schüttlers im Abschnitt BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND GERÄTE angegeben. Sowohl die Art als auch die Geschwindigkeit des verwendeten Schüttlers können die optischen Dichten und die Testergebnisse beeinflussen. Wird ein anderer Schüttlertyp und/oder eine andere Schüttelgeschwindigkeit verwendet, so ist der Benutzer dafür verantwortlich, die Leistung des Kits zu überprüfen.
28. Die Wells der Mikrotiterplatten dürfen nicht wiederverwendet werden, sie sind nur für den EINMALIGEN GEBRAUCH bestimmt.
29. Um Kondensation in den Wells der Mikrotiterplatte in feuchten Umgebungen zu vermeiden, öffnen Sie den Beutel mit der Mikrotiterplatte erst, wenn sie Raumtemperatur erreicht hat.
30. Jeder schwerwiegende Zwischenfall im Zusammenhang mit dem Produkt ist dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist, zu melden.

6. SICHERHEITS- UND WARNHINWEISE

6.1 BIOGEFAHREN

Die Reagenzien dieses Kits sollten als potentielle Biogefährdungen betrachtet und mit den gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie Blutproben gehandhabt werden. Alle Humanproben sollten gemäß der guten Laborpraxis und so, als ob sie infektiös wären, gehandhabt werden.

6.2 CHEMISCHE GEFAHREN

Direkten Kontakt mit allen Reagenzien des Kits vermeiden. Insbesondere den Kontakt mit dem TMB-Substrat (enthält Tetramethylbenzidin), der Stopplösung (enthält Schwefelsäure) und PMSF vermeiden. Bei Kontakt mit einem dieser Reagenzien mit reichlich Wasser abwaschen und das SDS für weitere Informationen lesen.

7. PROBENENTNAHME, -LAGERUNG UND -VORBEREITUNG

7.1 Probenentnahme und -lagerung

Pro Doppelbestimmung sind mindestens 0,5 ml EDTA-Plasma erforderlich. Eine ordnungsgemäße Probenentnahme ist für die genaue Bestimmung von Angiotensin-I unerlässlich. Die *In-vitro*-Erzeugung und der Abbau von Angiotensin-I können minimiert werden, wenn das empfohlene Entnahme- und Verarbeitungsverfahren wie unten beschrieben eingehalten wird.

1. Mindestens 2 ml venöses Blut in ein entsprechend beschriftetes EDTA-Blutentnahmeröhrchen entnehmen.
2. Die Probe bei Raumtemperatur für 15 Minuten bei 2000 g zentrifugieren.
3. Die Plasmaprobe in ein neues beschriftetes Aufbewahrungsröhrchen überführen.
4. Wenn die Proben sofort untersucht werden sollen, mit dem Abschnitt Probenvorbehandlung fortfahren, andernfalls können die Proben bis zu 6 Stunden bei Raumtemperatur oder bis zu 30 Tage bei -20 °C oder niedriger eingefroren gelagert werden. Mehr als zwei Gefrier-Auftau-Zyklen vermeiden.

Alle humanen Proben als mögliches biologisch gefährliches Material betrachten und entsprechende Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung treffen.

7.2 Probenvorbehandlung und -lagerung

Vor dem Test müssen alle verarbeiteten Plasmaproben gemäß dem Verfahren zur Generierung von Angiotensin-I wie unten beschrieben vorbehandelt werden. Am Ende dieses Verfahrens liegen zwei vorbehandelte Aliquots pro Plasmaprobe vor, ein 0 °C-Aliquot und ein 37 °C-Aliquot.

Verfahren zur Generierung von Angiotensin-I

1. Wenn eine frisch verarbeitete Plasmaprobe verwendet wird, mit Schritt 2 fortfahren. Wenn eine gefrorene Plasmaprobe verwendet wird, die Probe schnell auftauen, indem das Röhrchen in ein Wasserbad mit Raumtemperatur gestellt wird.
2. 0,5 ml der Plasmaprobe in ein neues Probenröhrchen pipettieren.
3. 5 µl der PMSF-Lösung (siehe Abschnitt 9. *Mitgelieferte Reagenzien*, 7. *PMSF*, für Anweisungen zur Vorbereitung) in das Röhrchen mit der Plasmaprobe aus Schritt 2 (Verhältnis 1:100) pipettieren. Das Röhrchen vortexen, um es gründlich zu mischen.
4. 50 µl des Generationspuffers in das Röhrchen mit der behandelten Probe aus Schritt 3 (im Verhältnis 1:10) pipettieren. Das Röhrchen vortexen, um es gründlich zu mischen.
5. 0,25 ml der Probe aus Schritt 4 in ein neues Probenröhrchen pipettieren. Es resultieren nun zwei Aliquots der behandelten Plasmaprobe. Eines mit 0 °C und das andere mit 37 °C beschriften.
6. Gleichzeitig das mit 37 °C gekennzeichnete Röhrchen in einen 37 °C-Inkubator und das mit 0 °C gekennzeichnete Röhrchen in ein Eisbad (0 – 4 °C) für 90 Minuten oder länger (nicht länger als 180 Minuten) stellen. Die Inkubationszeit ist zu notieren, da sie zur Berechnung der Plasmareninaktivität benötigt wird.
7. Am Ende der Inkubationszeit das 37 °C-Röhrchen für 5 Minuten in das Eisbad stellen, um es schnell abzukühlen.
8. Wenn die generierten Proben sofort getestet werden sollen, beide Probenröhrchen (0 °C und 37 °C) auf Raumtemperatur bringen, indem diese für 5 – 10 Minuten in ein Wasserbad (Raumtemperatur) gestellt werden. Die Proben sind nun bereit für den Test.
9. Wenn die generierten Proben zu einem späteren Zeitpunkt getestet werden sollen, beide Probenröhrchen (0 °C und 37 °C) sofort bei -20 °C oder niedriger für bis zu 3 Monate einfrieren. Die eingefrorenen Proben vor der Verwendung auf Raumtemperatur bringen, indem diese für 5 – 10 Minuten in ein Wasserbad (Raumtemperatur) gelegt werden. Die Proben sind nun bereit für den Test.



Die Standards und Kitkontrollen müssen **nicht** vorbehandelt werden; sie werden in einem gebrauchsfertigen Format geliefert.

8. BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERT REAGENZIEN UND GERÄTE

1. Kalibrierte Einkanalpipette zur Abgabe von 5 µl, 50 µl, 250 µl und 500 µl.
2. Kalibrierte Mehrkanalpipetten zum Abgeben von 50 µl, 100 µl und 150 µl.
3. Kalibrierte Mehrkanalpipetten zum Abgeben von 300 µl (bei manuellem Waschen).
4. Automatisches Waschgerät für Mikrotiterplatten (empfohlen).
5. Schüttler für Mikrotiterplatten:
 - a. Orbitalschüttler (3 mm Durchmesser), eingestellt auf 600 rpm oder
 - b. Pendelschüttler (1,5" Hublänge), eingestellt auf 180 Schwingungen/Minute.
6. Einweg-Pipettenspitzen.

7. Destilliertes oder deionisiertes Wasser.
8. Kalibrierter Absorptions-Mikrotiterplattenleser mit einem 450-nm-Filter und einer oberen OD-Grenze von 3,0 oder mehr.
9. Polypropylenröhrchen für die Verarbeitung und Vorbehandlung der Proben (z.B. Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen).
10. Ein 37 °C-Inkubator.
11. Ein Eisbad von 0 – 4 °C.
12. Ethanol (94% oder höhere Konzentration).
13. Wasserbad.

9. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

- 1. MS E-5631** 96 **Microplate** (Mikrotiterplatte) – Gebrauchsfertig
 Inhalt: Zwei mit polyklonalen Anti-Angiotensin-I-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatten mit 96 Wells (12x8), jeweils in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trocknungsmittel.
 Lagerung: 2 – 8 °C
 Stabilität: Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum.
 Nach dem Öffnen: Zehn Wochen haltbar.
- 2. MS E-5610** BIOTIN-AB **Biotin Conjugate** (Biotinkonjugat) – Gebrauchsfertig
 Inhalt: Ein Fläschchen mit Angiotensin-I-Biotinkonjugat in einem Puffer auf Proteinbasis mit Proteaseinhibitoren und einem quecksilberfreien Konservierungsmittel.
 Volumen: 30 ml/Fläschchen
 Lagerung: 2 – 8 °C
 Stabilität: Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum.
 Nach dem Öffnen: Zehn Wochen haltbar.
- 3. MS E-5640** CONJUGATE-CONC 100x **Streptavidin-HRP Conjugate Concentrate** (Streptavidin-HRP-Konjugatkonzentrat) – Konzentriert; Erfordert Vorbereitung
 Inhalt: Ein Fläschchen mit Streptavidin-Pferdrettich-Peroxidase (HRP)-Konjugat in einem Puffer auf Proteinbasis mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel.
 Volumen: 0,5 ml/Fläschchen
 Lagerung: 2 – 8 °C
 Stabilität: Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum.
 Nach dem Öffnen: Zehn Wochen haltbar.
 Nach der Vorbereitung: Die HRP-Konjugat-Arbeitslösung ist nach der Vorbereitung für 8 Stunden bei Raumtemperatur stabil.
 Vorbereitung der Streptavidin-HRP-Konjugat-Arbeitslösung: **X100 Vor Gebrauch 1:100 verdünnen**
 Vor der Verwendung 1:100 in Assay-Puffer verdünnen (z. B. 20 µl Konjugatkonzentrat in 1,98 ml Assay-Puffer). Wenn eine ganze Mikrotiterplatte verwendet werden soll, 200 µl Konjugatkonzentrat in 19,8 ml Assay-Puffer verdünnen. Verbleibende Reste verwerfen.

4. Standards und Kontrollen – Gebrauchsfertig

Kat.-Nr.	Symbol	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	1,0 ml
MS E-5603	STANDARD C	Standard C	0,5 ng/ml	1,0 ml
MS E-5604	STANDARD D	Standard D	1,5 ng/ml	1,0 ml
MS E-5605	STANDARD E	Standard E	4 ng/ml	1,0 ml

MS E-5606	STANDARD F	Standard F	10 ng/ml	1,0 ml
MS E-5607	STANDARD G	Standard G	25 ng/ml	1,0 ml
MS E-5608	STANDARD H	Standard H	60 ng/ml	1,0 ml
MS E-5651	CONTROL 1	Kontrolle 1	Die Sollwerte und Akzeptanzbereiche sind dem QC-Report zu entnehmen.	1,0 ml
MS E-5652	CONTROL 2	Kontrolle 2		1,0 ml

* Die nachstehenden Angaben sind ungefähre Konzentrationen, die genauen Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Etiketten der Fläschchen.

Inhalt: Acht Fläschchen mit Standardlösungen, die bestimmte Angiotensin-I-Konzentrationen enthalten. Puffer auf Proteinbasis mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel. Hergestellt durch Aufstockung des Puffers mit definierten Mengen Angiotensin-I.

Die Standards sind gegen das Referenzreagenz der Weltgesundheitsorganisation NIBSC Code 86/536 kalibriert.

Zwei Fläschchen mit Kontrollen, die unterschiedliche Angiotensin-I-Konzentrationen enthalten. Puffer auf Proteinbasis mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel. Zubereitet durch Aufstocken des Puffers mit definierten Mengen Angiotensin-I.

Lagerung: 2 – 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum.
Nach dem Öffnen: Zehn Wochen haltbar.

5. MS E-5613 **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer** (Assaypuffer) – Gebrauchsfertig

Inhalt: Ein Fläschchen enthält einen Puffer auf Proteinbasis mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel.

Volumen: 40 ml/Fläschchen

Lagerung: 2 – 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum.
Nach dem Öffnen: Zehn Wochen haltbar.

6. MS E-5616 **BUFF** **Generation Buffer** (Generationspuffer) – Gebrauchsfertig

Inhalt: Ein Fläschchen mit einem Puffer und einem nichttoxischen Antibiotikum.

Volumen: 5 ml/Fläschchen

Lagerung: 2 – 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum.
Nach dem Öffnen: Zehn Wochen haltbar.

Gefährdung:



H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.

H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.

7. MS E-5614 **PMSF** **Phenylmethylsulfonyl fluoride** (Phenylmethylsulfonylfluorid) – Erfordert Vorbereitung

Inhalt: Zwei Röhrchen mit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF).

Menge: 2 x Röhrchen

Lagerung: 2 – 8 °C

Stabilität: Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum.
Nach der Zubereitung: 2 Monate bei 2 – 8 °C haltbar.

Vorbereitung der PMSF-Arbeitslösung: Rekonstituieren, indem 0,5 ml Ethanol (94% oder höhere Konzentration) in das Röhrchen gegeben wird. Das Röhrchen verschließen und zwei Minuten lang vortexen, um es vollständig aufzulösen.

Nach dem ersten Gebrauch im Kühlschrank aufbewahren und vor der Verwendung erneut vortexen, um den Inhalt wieder aufzulösen. Die Flasche nicht unnötig offen halten.

Gefahren-
hinweise:

H301 Giftig bei Verschlucken.
H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H318 Verursacht schwere Augenschäden.

8. MS E-5655**SUBSTRATE****TMB Substrate** (TMB Substrat) – Gebrauchsfertig

Inhalt:

Ein Fläschchen mit Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem nicht DMF- oder DMSO-haltigen Puffer.

Volumen:

32 ml/Fläschchen

Lagerung:

2 – 8 °C

Stabilität:

Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum.
Nach dem Öffnen: Zehn Wochen haltbar.**9. MS E-5680****STOP-SOLN****Stopping Solution** (Stopplösung) – Gebrauchsfertig

Inhalt:

Ein Fläschchen mit 1 M Schwefelsäure.

Volumen:

12 ml/Fläschchen

Lagerung:

2 – 8 °C

Stabilität:

Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum.
Nach dem Öffnen: Zehn Wochen haltbar.Gefahren-
hinweise:

H315 Verursacht Hautreizungen.
H319 Verursacht schwere Augenreizung.

10. AA E-0030**WASH-CONC** 10x**Wash Buffer Concentrate** (Waschpufferkonzentrat) –
Konzentriert; Erfordert Vorbereitung

Inhalt:

Zwei Fläschchen, die Puffer mit einem nicht-ionischen Reinigungsmittel und einem quecksilberfreien Konservierungsmittel enthalten.

Volumen:

50 ml/Fläschchen (Menge: 2 Fläschchen)

Lagerung:

2 – 8 °C

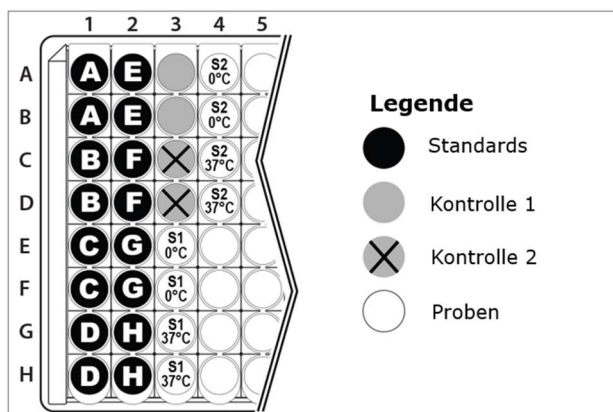
Stabilität:

Ungeöffnet: Haltbar bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum.
Nach dem Öffnen: Zehn Wochen haltbar.
Nach der Vorbereitung: Die Waschpufferarbeitslösung ist nach der Vorbereitung 2 Wochen lang stabil, vorausgesetzt, dass die gute Laborpraxis befolgt wird. Um mikrobielles Wachstum zu verhindern, die Waschpufferarbeitslösung in einem sauberen Behälter zubereiten und gekühlt (2 – 8 °C) lagern, wenn sie nicht verwendet wird.

Vorbereitung
der Wasch-
puffer-Ar-
beitslösung:

X10**Vor Gebrauch 1:10 verdünnen**

Vor Gebrauch 1:10 in destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen. Wenn eine ganze Mikrotiterplatte verwendet werden soll, 50 ml des Waschpufferkonzentrats in 450 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen.

10. EMPFOHLENES ASSAY-LAYOUT

11. TESTVERFAHREN

Probenvorbereitung:	
	Alle zu untersuchenden Proben müssen vor dem Test vorbehandelt werden (siehe Abschnitt 7.2. Probenvorbehandlung und -lagerung). Die Standards und Kitkontrollen müssen nicht vorbehandelt werden, da sie gebrauchsfertig geliefert werden.
Alle Kitkomponenten, Kontrollen und Proben müssen vor der Verwendung Raumtemperatur erreichen. Standardlösungen, Kontrollen und Proben sollten in doppelter Ausführung getestet werden. Sobald das Verfahren begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden.	
1.	Nachdem alle Bestandteile des Kits Raumtemperatur erreicht haben, diese vorsichtig durch Schwenken mischen .
2.	Die Streptavidin-HRP-Konjugatarbeitslösung und die Waschpufferarbeitslösung vorbereiten (siehe Abschnitt 9. Abschnitt "Mitgelieferte Reagenzien", 3. Streptavidin-HRP-Konjugatkonzentrat und 10. Waschpufferkonzentrat).
3.	Alle Proben vorbereiten , die getestet werden sollen. Siehe Abschnitt 7.2. Probenvorbehandlung und -lagerung. Für jede Plasmaprobe müssen sowohl die bei 0 °C als auch die bei 37 °C vorbehandelten Proben innerhalb desselben Tests zusammen durchgeführt werden.
4.	Die Wells der Mikrotiterplatte planen , die für Standards, Kontrollen und Proben verwendet werden sollen. Siehe Abschnitt 10. Empfohlenes Assay-Layout. Die Streifen aus dem Mikrotiterplattenrahmen, die nicht verwendet werden, nehmen und diese in den Beutel mit Trockenmittel legen. Den Beutel mit den nicht verwendeten Streifen wieder verschließen und diesen in den Kühlschrank stellen.
5.	Jeweils 50 µl des Standards, der Kontrolle und der vorbehandelten Probe (sowohl 0 °C- als auch 37 °C-Aliquots) in die zugewiesenen Wells pipettieren .
6.	100 µl des Biotinkonjugats in jedes Well pipettieren (die Verwendung einer Mehrkanalpipette wird empfohlen).
7.	Die Mikrotiterplatte 60 Minuten lang bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplattenschüttler inkubieren** .
8.	Die Wells der Mikrotiterplatten mit einem automatischen Mikrotiterplattenwaschgerät (bevorzugt) oder manuell wie unten beschrieben waschen . <u>Automatisch:</u> Mit einem automatischen Mikrotiterplattenwaschgerät werden 5 Waschzyklen mit 300 µl/Well der Waschpufferarbeitslösung (5 x 300 µl) durchgeführt. Ein Zyklus besteht darin, alle Wells abzusaugen und dann jedes Well mit 300 µl Waschpufferarbeitslösung zu füllen. Nach dem letzten Waschzyklus werden alle Wells abgesaugt und die Mikrotiterplatte anschließend fest gegen saugfähiges Papier geklopft, um Flüssigkeitsreste zu entfernen. <u>Manuell:</u> Beim manuellen Waschen werden 5 Waschzyklen mit 300 µl/Well der Waschpufferarbeitslösung (5 x 300 µl) durchgeführt. Ein Zyklus besteht darin, alle Wells abzusaugen, indem der Inhalt der Wells zügig über einen Spülbehälter entleert und dann 300 µl der Waschpufferarbeitslösung mit einer Mehrkanalpipette in jedes Well pipettiert wird. Nach dem letzten Waschzyklus werden alle Wells entleert, indem der Inhalt zügig über einen Abfallbehälter entleert wird und die Mikrotiterplatte anschließend fest gegen saugfähiges Papier geklopft, um Flüssigkeitsreste zu entfernen.
9.	150 µl der Streptavidin-HRP-Konjugatarbeitslösung in jedes Well pipettieren (die Verwendung einer Mehrkanalpipette wird empfohlen).
10.	Die Mikrotiterplatte 30 Minuten lang bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplattenschüttler inkubieren** .
11.	Die Wells der Mikrotiterplatte erneut wie in Schritt 8 beschrieben waschen .
12.	150 µl des TMB-Substrats in jedes Well pipettieren (die Verwendung einer Mehrkanalpipette wird empfohlen).
13.	Die Mikrotiterplatte 15 Minuten lang bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplattenschüttler inkubieren** .
14.	50 µl der Stopplösung in jedes Well in der gleichen Reihenfolge und Geschwindigkeit wie bei der Zugabe des TMB-Substrats pipettieren (die Verwendung einer Mehrkanalpipette wird empfohlen) und durch vorsichtiges Klopfen gegen die Platte mischen.
15.	Die optische Dichte (Absorption) in den Wells der Mikrotiterplatte innerhalb von 20 Minuten nach Zugabe der Stopplösung mit einem auf 450 nm eingestellten Absorptionsmikrotiterplattenlesegerät messen .

** Siehe Abschnitt 8. Benötigte, aber nicht mitgelieferte Reagenzien und Geräte für Optionen zum Schütteln von Mikrotiterplatten.

12. BERECHNUNGEN

1. Die mittlere optische Dichte für jedes Standard-, Kontroll- und Probenduplikat berechnen.
2. Eine 4-Parameter- oder 5-Parameter-Kurvenanpassung mit einer Immunoassay-Software verwenden, um eine Standardkurve zu erstellen.
3. Die Immunoassaysoftware berechnet die Konzentrationen der Kontrollen und Proben anhand der mittleren optischen Dichtewerte und der Standardkurve.
4. Unter Verwendung der erhaltenen Konzentrationen von Angiotensin-I (Ang-I) in den 37 °C- und 0 °C-Aliquots und der verwendeten Generationszeit wird die Plasmareninaktivität (PRA) in jeder Probe anhand der folgenden Gleichung berechnet:

$$PRA = \left(\frac{[Ang-I (37^{\circ}C)] - [Ang-I(0^{\circ}C)]}{Generation\ Time\ (h)} \right) \times 1.11$$

5. Wird in einer Probe ein Wert von mehr als 60 ng/ml gemessen, so ist die Probe (die dem Angiotensin-I-Generierungsverfahren unterzogen wurde) mit Standard A in einer Verdünnung von höchstens 1:10 zu verdünnen und die Probe erneut zu testen. Das erhaltene Ergebnis muss mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Hinweis: Die Proben dürfen erst verdünnt werden, nachdem sie das Verfahren der Angiotensin-I-Generierung durchlaufen haben; vor der Durchführung des Verfahrens der Angiotensin-I-Generierung dürfen keine Proben verdünnt werden.

13. QUALITÄTSKONTROLLE

Bei der Bewertung der Gültigkeit der Testergebnisse sollten folgende Kriterien berücksichtigt werden:

1. Die mittlere optische Dichte des Standards A entspricht dem im QC-Zertifikat angegebenen Akzeptanzbereich.
2. Der Standard mit der höchsten Konzentration entspricht dem in dem QC-Zertifikat angegebenen Akzeptanzbereich für die %-Bindung. % Bindung = (OD des Standards/OD des Standards A) x 100.
3. Die für die Kitkontrollen erhaltenen Werte liegen innerhalb der im QC-Zertifikat angegebenen Akzeptanzbereiche.
4. Die Ergebnisse der verwendeten externen Kontrollen liegen innerhalb der zulässigen Bereiche.

14. TYPISCHE DATEN

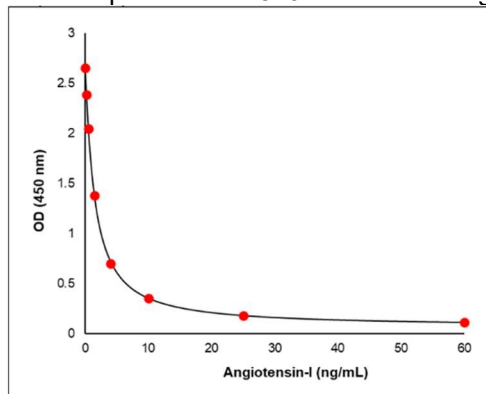
14.1 TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN

Nur Beispieldaten. **Nicht** zur Berechnung von Ergebnissen verwenden.

Standard	Mittlerer OD (450 nm)	% Bindung	Angiotensin-I (ng/ml)
A	2,654	100	0
B	2,388	90	0,2
C	2,044	77	0,5
D	1,383	52	1,5
E	0,701	26	4
F	0,353	13	10
G	0,182	7	25
H	0,114	4	60
Unbekannt	1,634	–	1,0

14.2 TYPISCHE STANDARDKURVE

Nur Beispielkurve. **Nicht** zur Berechnung der Ergebnisse verwenden.



15. LEISTUNGSMERKMALE**15.1 SENSITIVITÄT**

Die analytische Sensitivitätsstudie wurde gemäß der CLSI EP17-A2-Richtlinie durchgeführt. Die Hintergrundgrenze (LoB), die Nachweisgrenze (LoD) und die Bestimmungsgrenze (LoQ) für Angiotensin-I und PRA sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

Parameter	Angiotensin-I (ng/ml)	PRA (ng/ml/h)
LoB	0.093	0.024
LoD	0.166	0.059
LoQ	0,166	0,090

15.2 SPEZIFITÄT (KREUZREAKTION)

Die folgenden Verbindungen wurden auf Kreuzreaktion getestet, wobei Angiotensin-I zu 100% kreuzreagierte.

Verbindung	% Kreuzreaktion
Angiotensin I	100%
Angiotensin II	< 0,001%
Angiotensin III	< 0,001%
Angiotensin 1 – 5	< 0,001%
Angiotensin 1 – 7	< 0,001%
Angiotensin 1 – 9	0,122%
Renin Substrat	0,015%

15.3 INTERFERENZEN

Es wurde eine Interferenzstudie gemäß der CLSI-Richtlinie EP07-Ed3 durchgeführt. Drei Humanplasmaproben wurden mit potenziell interferierenden Substanzen versetzt. Bis zu den in der nachstehenden Tabelle aufgeführten Konzentrationen wurden keine signifikanten Interferenzen festgestellt.

Interferent	Testkonzentration
Acetaminophen	30 µg/ml
Acetylcystein	15 mg/dl
Acetylsalicylsäure	3 mg/dl
Ampicillin Na	7,5 mg/dl
Bilirubin konjugiert	20 mg/dl
Bilirubin unkonjugiert	40 mg/dl
Biotin	2,4 µg/ml
Captopril	1000 ng/ml
Captopril-Disulfid	10 µg/ml
Kathepsin B	100 ng/ml
Kathepsin D	10 ng/ml
Cefoxitin Na	300 mg/dl
Cyclosporin	0,18 mg/dl
Doxycyclin HCl	1,8 mg/dl
Enalaprilat-Dihydrat	200 ng/ml
Furosemid (Lasix)	50 µg/ml
Hämoglobin	1,25 g/l
HAMA	1000 ng/ml
Heparin	3300 U/l
Humanes Serumalbumin	52 g/l
Ibuprofen	21,9 mg/dl
Insulin	150 µIU/ml
Levodopa	0,75 mg/dl
Methyldopa	2,25 mg/dl
Metronidazol	12,3 mg/dl
Nicardipin (Loxen)	200 ng/ml
Phenylbutazon	32,1 mg/dl
Rheumafaktor (RF)	200 IU/ml
Rifampicin	4,8 mg/dl
Theophyllin	25 µg/ml
Triglyzeride	1000 mg/dl

15.4 PRÄZISION

Die Präzisionsstudien wurden gemäß der CLSI-Richtlinie EP05-A3 durchgeführt.

Wiederholbarkeit

Fünf EDTA-Plasmaproben, die den Bereich des Assays abdecken (von 0,17 bis 52,1 ng/ml Angiotensin-I), wurden von einem Anwender mit einer Kitcharge über 20 Tage durchgeführt, zwei Durchläufe pro Tag und zwei Wiederholungsmessungen pro Durchlauf, was insgesamt 80 Messungen pro Probe ergab (20x2x2-Design für jede Probe). Die Position der Proben in der Mikrotiterplatte wurde von einem Tag auf den anderen zufällig geändert. Die PRA-Generierungszeiten lagen zwischen 90 und 180 Minuten. Die Daten wurden mit einer verschachtelten Zwei-Wege-ANOVA analysiert und sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Probe	Mittelwert, PRA, ng/ml/hr	Wiederholbarkeit		Innerhalb des Labors	
		SD, PRA, ng/ml/hr	CV	SD, PRA, ng/ml/hr	CV
1	0.322	0.0367	11.4%	0.0615	19.1%
2	4.568	0.2060	4.5%	0.3565	7.8%
3	1.672	0.0768	4.6%	0.1275	7.6%
4	7.924	0.5005	6.3%	0.8042	10.1%
5	22,886	1,7496	7,6%	3,0223	13,2%

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde an drei Standorten unter Verwendung eines Versuchsplanmodells 3x5x5 (3 Standorte x 5 Testtage x 5 Wiederholungen pro Probe pro Tag) bewertet. Die Studie umfasste fünf Plasmaproben, die den Assaybereich des Kits abdeckten, sowie die beiden Kitkontrollen. Die Generationszeit änderte sich von Tag zu Tag und deckte den gesamten in dieser IFU empfohlenen Bereich ab (90 – 180 Minuten). Die Position der Kitkontrollen und Proben in der Mikrotiterplatte wurde von einem Tag zum anderen randomisiert. Die Daten wurden mit einer verschachtelten Zwei-Wege-ANOVA analysiert und sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst.

Kit Kontrollen	Mittelwert	Wiederholbarkeit		Innerhalb des Standortes		Reproduzierbarkeit	
	ng/ml	SD, ng/ml	CV%	SD, ng/ml	CV%	SD, ng/ml	CV%
1	0.966	0.051	5.2	0.081	8.4	0.140	14.5
2	9.850	0.370	3.8	0.701	7.1	0.820	8.3
PRA	ng/ml/h	SD, ng/ml/h	CV%	SD, ng/ml/h	CV%	SD, ng/ml/h	CV%
S1	0.285	0.049	17.2	0.053	18.7	0.065	22.9
S2	4.416	0.247	5.6	0.596	13.5	0.596	13.5
S3	1.431	0.101	7.1	0.147	10.3	0.256	17.9
S4	7.656	0.490	6.4	0.827	10.8	0.910	11.9
S5	22.763	2.379	10.5	3.520	15.5	3.985	17.5

15.5 LINEARITÄT

Die Linearitätsstudie wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP06-Ed2 mit drei humanen EDTA-Plasmaproben durchgeführt.

Jede Plasmaprobe wurde gemäß dem Angiotensin-I-Generierungsverfahren vorbehandelt, um ein Aliquot bei 0 °C und 37 °C herzustellen. Jedes Aliquot wurde mit Standard A in mehreren äquidistanten Konzentrationsstufen bis zu einer 1:10-Verdünnung verdünnt. Die Proben wurden in vierfacher Ausführung getestet und die Ergebnisse wurden mit den vorhergesagten Konzentrationen verglichen. Die statistische Analyse zeigt, dass der Test bis zu einer Verdünnung von 1:10 ausreichend linear ist, wenn Standard A als Verdünnungsmittel verwendet wird. Die Ergebnisse (in ng/ml/h) sind nachstehend tabellarisch aufgeführt:

Probe	Beobachtetes Ergebnis	Erwartetes Ergebnis	Wiederfindung %
1	33.7		–
1:2	17.9	16.9	105.9
1:4	8.33	8.43	98.8
1:10	3.24	3.37	96.1
2	7.11	–	–
1:2	3.33	3.56	93.5
1:4	1.59	1.78	89.3
1:10	0.60	0.71	84.5
3	1.66		–
1:2	0.68	0.83	81.9
1:4	0.33	0.42	78.6
1:10	0,13	0,17	76,5

15.6 WIEDERFINDUNG

Aufgestockte Proben wurden durch Zugabe bestimmter Mengen Angiotensin-I zu drei EDTA-Plasmaproben hergestellt. Die Angiotensin-I-Ergebnisse (in ng/ml) sind nachstehend tabellarisch aufgeführt:

Probe	Beobachtetes Ergebnis	Erwartetes Ergebnis	Wiederfindung %
1 Ungespiked	1.09	–	–
+ 1	2.16	2.09	103.3
+ 15	15.3	16.1	95.0
+ 50	41.8	51.1	81.8
2 Ungespiked	1.72	–	
+ 1	2.70	2.72	99.3
+ 15	16.8	16.7	100.6
+ 50	54.1	51.7	104.6
3 Ungespiked	1,01	–	
+ 1	1.76	2.01	87.6
+ 15	12.7	16.0	79.4
+ 50	41.7	51.0	81.8

16. REFERENZBEREICHE

Wie bei allen klinischen Tests sollte jedes Labor Daten sammeln und seinen eigenen Bereich von erwarteten Normalwerten festlegen. Daten aus Literaturangaben [18].

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














17. LITERATUR

1. Spence JD. (1999) Physiologic tailoring of therapy for resistant hypertension: 20 years' experience with stimulated renin profiling. *Am J Hypertension*. 12(11 Pt 1):1077-83.
2. Egan BM, Basile JN, Rehman SU, Davis PB, Grob CH, III, Riehle JF, et al. (2009) Plasma Renin test-guided drug treatment algorithm for correcting patients with treated but uncontrolled hypertension: a randomized controlled trial. *Am J Hypertens*. 22(7):792-801.
3. Tan ACITL, Kloppenborg PWC, Benraad TJ. (1989) Influence of Age, Posture and Intra-Individual Variation on Plasma Levels of Atrial Natriuretic Peptide. *Annals of Clinical Biochemistry*. 26(6):481-486.
4. Tiu, S. C., Choi, C. H., Shek, C. C., Ng, Y. W., Chan, F. K., Ng, C. M., & Kong, A. P. (2005). The use of aldosterone-renin ratio as a diagnostic test for primary hyperaldosteronism and its test characteristics under different conditions of blood sampling. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(1), 72–78.
5. Sealey JE, Gerten-Banes J, Laragh JH (1972), The renin system: Variations in man measured by radioimmunoassay or bioassay *Kidney International* 1:240-253.
6. Sealey, J. E., Gordon, R. D., & Mantero, F. (2005). Plasma renin and aldosterone measurements in low renin hypertensive states. *Trends in endocrinology and metabolism*. TEM, 16(3), 86–91.
7. J. Brossaud and J.B. Corcuff, (2009) Pre-analytical and Analytical Considerations for the Determination of Plasma Renin Activity, *Clinica Chimica Acta* 410:90–92.
8. F. K. Suessenbach, B. B. Burckhardt. Levels of angiotensin peptides in healthy and cardiovascular/renal - diseased paediatric population—an investigative review. *Heart Failure Reviews* (2019) 24:709–723
<https://doi.org/10.1007/s10741-019-09797-y>
9. Guoqing Yao, Wenjing Li, Wenzhao Liu, et al. (2021) The Level and Significance of Circulating Angiotensin-III in Patients with Coronary Atherosclerosis. *Hindawi Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 1704762, <https://doi.org/10.1155/2021/1704762>
10. Valle Martins AL, da Silva FA, Bolais-Ramos L, et al. (2021) Increased circulating levels of angiotensin-(1–7) in severely ill COVID-19 patients. *ERJ Open Res* 7: 00114-2021 [DOI: 10.1183/23120541.00114-2021].
11. Clare A. McKinney, Caroline FATTAH, Christopher M. Loughrey et al. (2014) Angiotensin-(1–7) and angiotensin-(1–9): function in cardiac and vascular remodelling. *Clinical Science*. 126, 815–827 (Printed in Great Britain) doi: 10.1042/CS20130436
12. Stirati G, de Martino A, Mene P, et al. (1983) Plasma renin activity: effect of temperature during blood processing. *J Clin Chem Clin Biochem* 529-31
13. Ruth Lapworth, Sally E Green and Frances Short. (1990) In vitro stability of assayed renin activity in plasma and whole blood. *Ann Clin Biochem* 27: 78-79
14. Zoltan Locsei, Karoly Racz, Attila Patocs et al. (2009). Influence of sampling and storage conditions on plasma renin activity and plasma renin concentration. *Clinica Chimica Acta* 402 203–205
15. Morganti, A; Lonati, C; Turolo, L (2010) Brief Cryoactivation Markedly Affects Plasma Renin Activity and Direct Renin Measurement in Low Renin Samples: PP.24.473, *Journal of Hypertension*: 28 p e388 doi: 10.1097/01.hjh.0000379399.50039.3c.
16. Sealey JE. (1991) Plasma renin activity and plasma prorenin assays. *Clin Chem*. 37(10 Pt 2):1811-9. PMID: 1914195.
17. Campbell, D. J., Nussberger, J., Stowasser, M., Danser, A. H., Morganti, A., Frandsen, E., & Ménard, J. (2009). Activity assays and immunoassays for plasma Renin and prorenin: information provided and precautions necessary for accurate measurement. *Clinical chemistry*, 55(5), 867–877.
18. 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.

18. ÄNDERUNGSHISTORIE

Vorherige Version:	6.0	Neue Version:	7.0
Änderungen:	Designänderung des Produkts und neues IFU-Format; alle Informationen in der IFU wurden überarbeitet.		
Vorherige Version:	7.0	Neue Version:	8.0
Änderungen:	<p>7.2 Probenvorbehandlung und -lagerung Verfahren zur Generierung von Angiotensin-I</p> <p>8. Hinzugefügt: Wenn die generierten Proben sofort getestet werden sollen, ... Die Proben sind nun bereit für den Test.</p> <p>9. Hinzugefügt: Wenn die generierten Proben zu einem späteren Zeitpunkt getestet werden sollen, ... Informationen darüber hinzugefügt, wie die gefrorenen generierten Proben vor dem Test auf Raumtemperatur gebracht werden können.</p> <p>9. Mitgelieferte Reagenzien</p> <p>9. Stopplösung</p> <p>Das Gefahrenpiktogramm GHS05 wurde durch das Gefahrenpiktogramm GHS07 ersetzt.</p>		

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta