



Istruzioni per l'Uso

Renin (active) ELISA

Dosaggio immunoenzimatico per la determinazione *diagnostica in vitro* quantitativa di Renina Attività nel siero e plasma umani.

REF **A GE!53\$\$**

 **96**

   **2-8 °C**

EU: **IVD**  U.S.: *For research use only.
Not for use in diagnostic procedures.*



Meridian Healthcare srl

Via Caronda, 446 SC/A - 95129 Catania - Italy
Tel. +39 095 725 68 69 - Fax: +39 095 725 44 54
info@meridianhealthcare.it
www.meridianhealthcare.it



1 INTRODUZIONE

1.1 Uso Previsto

Il Renin (active) ELISA è un dosaggio immunoenzimatico per la misurazione quantitativa *diagnostica, in vitro* della Renina attiva nel siero e nel plasma umano.

Le misurazioni della renina si usano per la diagnosi ed il trattamento di alcuni tipi di ipertensione.

1.2 Sommario e descrizione

La renina è un enzima (Mw di 37 kDa) appartenente alla famiglia delle proteasi dell'acido aspartico. La Renina è un membro del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS) che controlla la pressione del sangue, il flusso ematico renale, la filtrazione glomerulare e l'omeostasi sodio-potassio.

La Renina si produce sotto forma di prorenina, un precursore inattivo della renina con 386 aminoacidi, nelle cellule iuxtaglomerulari del rene (1). In risposta ad una pressione intrarenale bassa, ad un riassorbimento ridotto del sodio, ad ipokaliemia o ad attività del sistema nervoso simpatico, la renina attiva può essere rilasciata o da un deposito situato nel rene, o - in alternativa - può essere generata dalla prorenina, tramite il clivaggio di un segmento costituito da 46amminoacidi all'NTD della prorenina (2,3). La secrezione di prorenina nel sangue è continua, in contrasto con il rilascio strettamente controllato di renina e la concentrazione di prorenina nel sangue è approssimativamente 100 volte più alta di quanto non lo sia la renina attiva (4,5). Dopo il suo rilascio e la sua attivazione, la renina solubile è mediatrice del clivaggio dell'angiotensinogeno α_2 -globulina nel suo peptide precursore angiotensina I, che viene poi elaborato dall'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) in octapeptide angiotensina II. Tutte le azioni dell'angiotensina II sono mediate dall'angiotensina tipo 1 (AT1) accoppiata alla proteina G e dai recettori dell'angiotensina tipo 2 (AT2) (6). Gli effetti fisiologici diretti dell'angiotensina II comprendono: vasocostrizione, aumento del riassorbimento tubulare del sodio e dei cloridi, ritenzione idrica e rilascio di ormone aldosterone dalla corteccia surrenale, dell'ormone antidiuretico (ADH, vasopressina) dalla ghiandola pituitaria posteriore e dell'ormone adrenocorticotropico (ACTH, Corticotropina) dalla ghiandola pituitaria anteriore. Il rilascio di questi ormoni è di ulteriore appoggio alla ritenzione di sodio ed alla secrezione di potassio/H⁺ nel rene, aumentando la sensazione di sete ed il desiderio di sale tramite l'organo subfornicale del cervello (7,8). In un loop di feedback negativo, la secrezione di renina è ridotta da un'alta concentrazione di angiotensina II (9) e il rilascio di aldosterone viene ridotto dalla riduzione del potassio (10). Accanto all'azione della renina solubile, il legame tra renina e prorenina al recettore della renina ATP6AP2 legato alla membrana nel cervello, nel cuore, nella placenta, nel fegato, nel rene e nel pancreas aumenta l'efficienza del clivaggio dell'angiotensinogeno ed induce effetti intracellulari indipendenti dall'angiotensina attivando le proteine chinasi ERK1 ed ERK2 attivate da mitogeni (11). La renina plasmatica è un buon indice di attività del RAS. In caso di disfunzione del RAS, il dosaggio della renina permette di rilevare le implicazioni cliniche ai fini di diagnosi, trattamento e follow up. La renina attiva dev'essere misurata come segue:

- Diagnosi di ipertensione (pressione sanguigna alta: se la pressione diastolica è > 90 mm Hg e la pressione sistolica è > 140 mm Hg; le linee guida dell' European Society of Cardiology e dell' European Society of Hypertension)
- Diagnosi differenziata di iperaldosteronismo (iperaldosteronismo primario, iperaldosteronismo secondario, iperaldosteronismo con o senza ipertensione, pseudoiperaldosteronismo)
- Diagnosi di deficit isolato nei corticoidi minerali
- Diagnosi differenziata di ipokaliemia (iperaldosteronismo secondario o ipermineralcorticismo primario)
- Rilevamento di tumori secernenti renina nel rene
- Monitoraggio di terapia glicocorticoidea
- Diagnosi di responso insufficiente a trattamento antiipertensivo

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit Renin (active) ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA) basato sul principio sandwich. I pozzetti sono rivestiti con un anticorpo monoclonal (sorca) diretto contro un unico sito antigenico della molecola Renina attiva.

Un'aliquota di un campione di paziente contenente Renina endogena viene incubato nel pozzetto insieme al Tampone Dosaggio. Dopo l'incubazione il coniugato non legato è eliminato attraverso lavaggi.

Infine, coniugato enzimatico, che è un anticorpo monoclonale anti-Renina coniugato con perossidasi di rafano, è aggiunto e dopo l'incubazione il coniugato non legato è eliminato attraverso lavaggi.

La quantità della perossidasi legata è proporzionale alla concentrazione di Renina nel campione. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di Renina attiva nel campione del paziente.

3 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro. Solo per uso professionale.
2. Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
3. Leggere attentamente le istruzioni prima di iniziare il test. Utilizzare il manuale fornito nel kit. Assicurarsi di aver compreso tutte le indicazioni.
4. La micropiastra contiene strisce snap-off. Pozzi inutilizzati devono essere conservati a 2-8 °C in busta sigillata e utilizzati nel telaio fornito.
5. Pipettaggio di campioni e reagenti deve essere fatto più velocemente e la stessa sequenza per ogni passaggio.
6. Utilizzare serbatoi solo per singoli reagenti. Questo vale soprattutto per i serbatoi di substrato. Utilizzando un serbatoio per l'erogazione di una soluzione di substrato che era stati precedentemente utilizzata per la soluzione di coniugato può girare la soluzione colorata. Non versare i reagenti in fiale come contaminazione di reagente può accadere.
7. Mescolare il contenuto dei pozzetti di micropiastra accuratamente per garantire buoni risultati di test. Non riutilizzare micropozzetti.
8. Non lasciate che pozzetti asciutto durante il dosaggio; aggiungere i reagenti immediatamente dopo aver completato i passaggi di risciacquo.
9. Consentire i reagenti a temperatura ambiente (21-26 °C) prima di iniziare il test. Temperatura influenzerà le letture di assorbanza del dosaggio. Tuttavia, i valori per i campioni di pazienti non subiranno.
10. Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
11. Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
12. Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
13. L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
14. Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
15. Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
16. Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati immagazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
17. Il contatto con la soluzione stop (Stop Solution) dovrebbe essere evitato perché contiene 0.5 M H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
18. Alcuni reagenti contengono Proclin 300, BND e/o MIT come conservanti. In caso di contatto con gli occhi o la pelle, lavare immediatamente con acqua.
19. Il substrato TMB substrate ha un effetto irritato sulla pelle e mucose. In caso di contatto possibile, lavare gli occhi con un volume abbondante di acqua e la pelle con sapone e abbondante volume acqua. Lavare gli oggetti contaminati prima riutilizzano. Se inalato, prendere la persona all'aria aperta.
20. I reagenti preparati e usati e le sostanze chimiche del kit devono essere trattati come rifiuti pericolosi secondo le normative di sicurezza e la legislazione vigente nel Paese in cui il prodotto viene usato.
21. I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente alla Meridian Healthcare.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12x8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con l'anti-umano Renina anticorpo (monoclonal).
2. **Standard** (Standard 0-5), 6 flaconi, (liofilizzati); 1 mL
Concentrazioni: 0; 4; 16; 32; 64; 128 pg/mL
Conversione: 1 pg/mL = 1.44 μ LU/mL
Gli standard sono calibrati contro lo Standard Internazionale WHO per la Renina 63/356) vedi „Preparazione dei Reagenti “. Contiene conservante senza mercurio.
3. **Control Low & High** (Controllo Basso & Elevato), 2 flaconi, (liofilizzati); 1 mL
vedi „Preparazione dei Reagenti“
Per le concentrazioni /gli intervalli accettabili vedere le etichette sulle provette o il Certificato di Controllo Qualità. Contiene conservante senza mercurio.
4. **Assay Buffer** (Tampone Dosaggio), 1 flacone, 20 mL, pronto all'uso,
Contiene conservante senza mercurio.
5. **Enzyme Conjugate** (Coniugato Enzimatico), 1 flacon, 14 mL, pronto all'uso,
anti-umano Renina anticorpo (monoclonal); coniugato alla perossidasi di rafano.
Contiene conservante senza mercurio.
6. **Substrate Solution** (Soluzione di Substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso,
Benzidina tetrametilico (TMB).
7. **Stop Solution** (Soluzione Stop), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso
Contiene 0.5M H₂SO₄.
Evitare il contatto con la Soluzione Stop. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
8. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X),
vedi „Preparazione dei Reagenti“

Nota: Ulteriore Tampone Dosaggio per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 \pm 10 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.
- Timer
- Carta milimetrata semi logaritmica o software per la riduzione dei dati

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per sei settimane se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Standards

Ricostituire il contenuto liofilizzato dei flaconi con gli standard con 1.0 mL acqua distillata.

Nota: *Gli standard ricostituiti sono stabili per 14 giorni a 2 °C a 8 °C. Per periodi piu' lunghi congelare a -20 °C.*

Controls

Ricostituire il contenuto liofilizzato con 1.0 mL acqua distillata e far riposare per almeno 10 minuti. Mescolare alcune volte prima dell'uso.

Nota: I controlli ricostituiti sono stabili 14 giorni a 2 °C a 8 °C. Per periodi piu' lunghi congelare a -20 °C.

Wash Solution

Aggiungere acqua deionizzata a *Wash Solution* (40X concentrata).

Diluire 30 mL *Wash Solution* concentrata con 1170 mL di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 mL. *La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.*

4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza.

4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta M.H., al piu' tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o plasma (EDTA o eparina plasma) può essere usato per questo test.

Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

Le condizioni alle quali i campioni sono raccolti devono essere controllati accuratamente, dato che alcuni fattori fisiologici possono influenzare la secrezione della renina. Questi includono:

- La posizione: il paziente deve rimanere sdraiato per piu' di 1 ora o deve stare in piedi per piu' di 1 ora.
- Le oscillazioni giornalieri di renina: il campionamento deve essere effettuato tra le ore 7 e 10 del mattino, se possibile.
- La dieta: il contenuto di sodio nella dieta deve essere noto ed eventualmente controllato dalla misura di sodio nell'urina per un periodo di 24 ore.
- La medicazione: il livello di renina attiva puo' essere influenzata da una medicazione anti-ipertensione (p.es. Diuretici, inibitori ACE, beta bloccanti adrenergici o vasodilatatori).
- La gravidanza: i livelli di renina attiva ed inattiva cresce durante la gravidanza.
- Il ciclo mestruale: il livello di renina attiva cresce nella seconda fase del ciclo (il campionamento deve essere effettuato possibilmente durante la prima fase).
- L'eta': il livello di renina attiva decresce con l'eta'.

NOTA:

Sieri di pazienti con tumori possono contenere elevati valori di renina.

5.1 Collezione dei campioni**Siero:**

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma:

Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni devono essere chiusi e *conservati a temperatura ambiente e NON conservati a 2 °C - 8 °C prima dell'analisi*, dato che la crioattivazione della prorenina può occorrere alla temperatura di 2 °C - 8 °C, dando risultati falsi positivi (12,13)

Se i campioni non possono essere testati entro 4 ore dalla raccolta, conservarli congelati a -20 °C o inferiore.

Si raccomanda di congelare e scongelare i campioni evitando il campo di temperatura di 2 °C - 8 °C.

Un bagnomaria di ghiaccio secco ed etanolo può essere usato per un congelamento rapido.

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con *Assay Buffer* e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

a) diluizione 1:2: 75 µL siero + 75 µL *Assay Buffer* (agitare bene)

b) diluizione 1:5: 30 µL della diluizione a) + 120 µL *Assay Buffer* (agitare bene).

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 EseW n]cbY del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **150 µL Assay Buffer** in ogni pozzetto.
3. Pipettare **50 µL** di ogni **Standard, Control** e **campione** nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
4. Incubare per **90 minuti** a temperatura ambiente su un agitatore per piastre con 300 - 700 rpm.
5. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **4 volte** con **Wash Solution** diluita (**300 µL** in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante: La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto esequimento del lavaggio!
6. Pipettare **100 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.
7. Incubare per **90 minuti** a temperatura ambiente su un agitatore per piastre con 300 - 700 rpm.
8. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **4 volte** con **Wash Solution** diluita (**300 µL** in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
9. Aggiungere **100 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
10. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente.
11. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
12. Determinare la densità ottica a **450 ± 10 nm** con un fotometro per microtiter-piastre **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Rilevamento dei rigi `UH`

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (DO) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle DO si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X)
3. Utilizzando il valore medio delle DO per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I risultati in IFU sono stati calcolati automaticamente usando un (fitting) avvicinamento con il 4 PL (4 Parameter Logistics). Altri funzioni usati per l'elaborazioni dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione piu' elevata dello standard piu' concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'eseguimento del test.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	0.09
Standard 1 (4 pg/mL)	0.19
Standard 2 (16 pg/mL)	0.44
Standard 3 (32 pg/mL)	0.78
Standard 4 (64 pg/mL)	1.14
Standard 5 (128 pg/mL)	2.48

7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test (Renin active) ELISA, i seguenti valori sono stati ottenuti nel plasma:

	n	media (pg/mL)	mediano (pg/mL)	99. percentile (pg/mL)	95. percentile (pg/mL)	5. percentile (pg/mL)	1. percentile (pg/mL)
Donatori sani in posizione supina	26	17,72	15,31	35,64	31,90	4,66	2,99
Donatori sani in posizione eretta	26	23,95	23,27	47,85	42,30	7,54	3,84

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test Aldosterone ELISA e il test Denin ELISA, i seguenti quozienti aldosterone-renina sono stati ottenuti nel plasma:

Quozienti Aldosterone-Renina (pg/mL / pg/mL)

n	media	mediano	99. percentile	95. percentile	5. percentile	1. percentile
89	8,68	5,30	49,65	28,06	0,68	0,45

I soli risultati non dovrebbero essere l'unica motivazione alla base di una scelta terapeutica. Devono essere correlati ad altre osservazioni cliniche e test diagnostici.

8 CONTROLLO QUALITÀ

Buona pratica di laboratorio richiede che controlli da eseguire con ogni curva di calibrazione. Un numero statisticamente significativo di controlli dovrà essere analizzato per stabilire i valori medi e le gamme accettabili per assicurare la corretta esecuzione.

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la Meridian Healthcare.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0.81 – 128 pg/mL.

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Le seguenti sostanze sono state testate per cross-reattività del dosaggio:

Cross-reattività media con Prorenina era 0.71 % (valore medio quando prorenina era fortificata in un intervallo di concentrazione da 256 – 4096 pg/mL). Tuttavia, la cross-reattività osservata può rappresentare solo una contaminazione della preparazione di prorenina ricombinante con renina attiva a causa di auto-attivazione.

Reattività crociata no era rilevabile contro albumina sierica umana, gamma globulina umana, epcidina umana, e pepsina.

9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica del ELISA è stata calcolata mediante l'aggiunta di 2 deviazioni standard per la media di 20 analisi replicare dello Standard Zero (S0) ed è stata trovata per essere 0.81 pg/mL.

9.4 Precisione

9.4.1 Intra-Dosaggio

L'intra-dosaggio è mostrato di seguito:

Campione	1	2	3
Media (pg/mL)	9.12	26.98	43.99
CV (%)	8.73	3.88	4.24
n =	20	20	20

9.4.2 Inter-Dosaggio

L'inter-dosaggio è mostrato di seguito:

Campione	1	2	3
Media (pg/mL)	19.28	36.20	66.72
CV (%)	8.88	6.27	5.19
n =	12	12	12

9.5 RYW dYfo

Campioni sono stati fortificato con l'aggiunta di soluzioni con concentrazioni note di Renina in rapporto 1:1. Il recupero % è stato calcolato da moltiplicazione del rapporto tra le misure e i valori attesi con 100 (valori attesi = (Renina endogena + Renina aggiunta) / 2; a causa di una diluizione di 1:2 del plasma con material^A fortificato).

		Campione 1	Campione 2	Campione 3
Concentrazione [pg/mL]		16.71	40.21	15.97
Media Recupero		92.92	95.09	96.00
Intervallo di Recupero [%]	da	85.99	87.93	86.83
	al	105.47	101.37	105.25

9.6 Linearità

		Campione 1	Campione 2	Campione 3
Concentrazione [pg/mL]		45.16	53.20	126.0
Media Recupero		101.7	102.8	98.5
Intervallo di Recupero [%]	da	96.7	95.6	94.9
	al	108.6	114.6	100.8

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Quando la procedura viene eseguita con una comprensione completa dell'istruzione per l'uso e con aderenza alla buona prassi di laboratori saranno ottenuti risultati affidabili e riproducibili.

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare i risultati.

10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 1 mg/mL), bilirubina (fino a 0.5 mg/mL) e trigliceridi (fino a 30 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

10.2 Droghe interferenti

L'inibitore della renina "Aliskiren" causa un'inalzamento dell'immunoreattività della renina attiva in maniera dosis-dipendente, da 0.54 µM (+ 121 %) fino a 540 µM (+151 %).

Il livello di renina attiva nel plasma può essere affetto da medicazione anti-ipertensiva (p.es. Diuretici, inibitori ACE, bloccatori beta adrenergici o vasodilatatori).

10.3 Effetto Hook Ud alti dosaggi

Nessun effetto hook (di agglomerazione) è stato osservato in questo test fino a 8200 pg/mL di Renina.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test. I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta IBL.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12 BIBLIOGRAFIA

1. Imai T, Miyazaki H, Hirose S, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1983) 80, 7405–7409.
2. Reudelhuber TL, Ramla D, Chiu L, et al. Proteolytic processing of human prorenin in renal and non-renal tissues. *Kidney Int.* (1994) 46, 1522–1524.
3. Neves FA, Duncan KG, Baxter JD. Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. *Hypertension* (1996) 27, 514–517.
4. Müller DN, Luft FC. Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage. *Clin J Am Soc Nephrol.* (2006) 1, 221-8.
5. Toffelmire EB, Slater K, Corvol P, et al. Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. Studies using a direct immunoradiometric assay. *J Clin Invest.* (1989) 83, 679–687.
6. Carey RM, Padia SH. Angiotensin AT2 receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure. *Trends Endocrinol Metab.* (2008) 19, 84-7.
7. Koeppen BM, Stanton BA. *Renal Physiology* (4th ed.). Philadelphia, PA. Mosby Physiology Monograph Series, 2007.
8. Navar LG, Inscho EW, Majid DSA, et al. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol. Rev.* (1996) 76, 425–536.
9. Müller MW, Todorov V, Krämer BK, Kurtz A. Angiotensin II inhibits renin gene transcription via the protein kinase C pathway. *Pflugers Arch.* (2002) 444, 499-505.
10. Spät A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev.* (2004) 84, 489-539.
11. Nguyen G., Delarue F., Burcklé C., et al. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest.* (2002) 109, 1417–1427.
12. Pitarresi TM., Rubattu S, Henrikson R, Sealey JE. Reversible cryoactivation of recombinant human prorenin. *J. Biol. Chem.* (1992) 267, 11753-9.
13. Nicar MJ. Specimen processing and renin activity in plasma. *Clin. Chem.* (1992) 38, 598.