



ANGIOTENSIN II

RIA

RK-A22 100 tests

Revision date: 2012-11-20

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN Angiotensin II is a double antibody radioimmunoassay designed for the quantitative *in vitro* diagnostic determination of immunoreactive Angiotensin II in extracted EDTA plasma.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The BÜHLMANN Angiotensin II radioimmunoassay measures immunoreactive Angiotensin II (Ang II) by a double antibody radioimmunoassay using a modification of the method reported by Emanuel *et al.* (1). Extracted EDTA plasma samples, calibrators and controls are first preincubated for 16 hours with an anti-Ang II antibody. ¹²⁵I-Ang II is added and competes with Ang II present in samples, calibrators and controls for the same antibody binding sites in a second 6 hours incubation step. After this incubation, a solid-phase second antibody is added to the mixture. The antibody-bound fraction is precipitated and counted in a gamma-counter.

It is recommended to treat plasma samples with bestatin or an equivalent angiotensinase inhibitor during blood sampling in order to prevent degradation of Ang II (5-8; see also Specimen Collection and Storage).

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

| Reagents | Quantity | Code | Reconstitution |
|---|------------------|--------------|---|
| Extraction Columns (1 ml) phenylsilylsilica reversed phase extraction columns | 10 pieces | B-AEC | |
| Tris Buffer | 1 vial 100 ml | B-A22-TB | Ready to use |
| Antiserum rabbit anti-Ang II antibody | 1 vial 10 ml | B-A22-AS | Ready to use |
| Tracer ¹²⁵ I-Ang II | 1 vial 11 ml | B-A22-TR | Ready to use |
| Calibrators¹⁾ lyoph. synthetic Ang II | 5 vials | B-A22-CASET | Reconstitute each vial with 5 ml of Tris Buffer |
| Controls Normal / High²⁾ lyophilized Ang II in a buffer matrix | 2 vials | B-A22-CONSET | Reconstitute each vial with 5 ml of Tris Buffer |
| Second Antibody Solid phase bound anti-rabbit second antibody | 1 vial 11 ml | B-A22-AB2 | Ready to use |

Table 1

¹⁾ After reconstitution, the calibrator solutions will contain 2, 5, 20, 100 and 500 pg/ml of Ang II, respectively.

²⁾ See QC data sheet for the lot specific amount of Ang II

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

| Unopened Reagents | |
|--|--|
| Columns should be stored at 18-28°C. All other kit components are stable at 2-8°C until the expiration date printed on the labels. | |
| Opened / Reconstituted Reagents | |
| Extraction Columns | Used columns should be stored at 18-28°C and protected from dust and light. |
| Tris Buffer | Stable at 2-8°C until expiration date printed on the label. |
| Antiserum | |
| Tracer | |
| Calibrators | Stable for at least 2 months after reconstitution at -20°C. |
| Controls | |
| Second Antibody | Store refrigerated (Do not freeze!) Stable at 2-8°C until expiration date printed on the label. |

Table 2

PRECAUTIONS

SAFETY PRECAUTIONS

- Radioactive Material: This kit contains radioactive material which does not exceed 56 kBq of ¹²⁵Iodine.
- Receipt, acquisition, possession, use, and transfer are subject to the local regulations. Unused solutions and radioactive waste should be disposed of according to local State and Federal regulations.

TECHNICAL PRECAUTIONS

- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- Incorrect results for standard curve, controls or samples may be obtained, if the 2nd antibody was not mixed sufficiently before pipetting. Do not freeze the 2nd antibody!
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Let the reagents adjust to reach room temperature. Reconstitute the lyophilized reagents as indicated. Mix well (vortex) the reagents before use.
- Counting time should be selected in order to keep statistical counting error small: e.g., at 2000 cpm the counting error is at 5%; at 10000 cpm it is only 1%.
- If the initial concentration of an unknown sample reads above the highest calibrator, the sample should be further diluted with Tris buffer and tested again according to the assay procedure.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 100 µl, 500 µl, 1000 µl, and 5000 µl precision pipettes with disposable tips.
- Disposable polypropylene tubes (13 x 100 mm) for preparation of plasma extracts.
- Conical polystyrene tubes for the assay (e.g. Sarstedt 57.477).
- Extraction vacuum manifold for applying the extraction columns (optional).
- Methanol (HPLC grade recommended).
- Distilled or deionized water.
- Bestatin solution¹⁾ for sample collection (optional).
- Ice-bath
- Refrigerated centrifuge.
- Vortex mixer.
- Stir bar and magnetic stirrer.
- Aspiration device.
- Evaporator.
- Gamma-counter.

¹⁾The Bestatin reagent can be ordered separately (order code: B-A22-BST).

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The procedure calls for 1.2 ml of EDTA plasma for duplicate determinations. Appropriate sample collection is essential to ensure accurate results of the Ang II analysis. Hemolyzed, highly icteric or lipemic samples may adversely effect results.

Recommended Collection Procedure: It is important to prevent the *in vitro* generation of Ang I and Ang II from angiotensinogen and Ang I by renin and ACE, respectively, as well as the *in vitro* degradation of Ang II to Ang III by angiotensinases. The *in vitro* generation and degradation of Ang II can be minimized by following this recommended collection procedure:

Collection: Collect 5 ml of blood from **recumbent** patient into a pre-chilled EDTA venipuncture tube or plastic syringe. Immediately add 100 µl of ready to use Bestatin solution (see above) or equivalent angiotensinase inhibitor (*cf.* 5,7-9) per 5 ml EDTA-blood sample. Place sample immediately in an ice-bath and proceed with plasma separation within **1 hour**.

Separation: Centrifuge sample for 15 minutes at 1000 x g and 2-8°C, separate the plasma from the cells, aliquot and freeze the specimen immediately in polypropylene tubes at -20°C or less or extract plasma samples without delay.

Alternative Collection Procedure: Collect 5 ml of blood from **recumbent** patient into a pre-chilled EDTA venipuncture tube or a plastic syringe and immediately place the sample on ice. Centrifuge at 1000 x g and 2-8°C **immediately** after collection. Separate the plasma from the cells, aliquot and freeze the specimen at -20°C in polypropylene tube or extract plasma samples without delay.

COLUMN EXTRACTION OF PLASMA SAMPLES

The use of a reversed phase extraction method is essential for obtaining accurate Ang II results. The best recoveries are obtained with phenylsilylsilica extraction columns (*cf.* 2-5). The extraction columns provided with this kit can **each be utilized up to five times** if used according to the extraction procedures described in this protocol. Used columns should be stored at 18-28°C and protected from light and dust. In order to avoid clogging of columns, **filter or centrifuge samples containing particles** such as fibrin clots prior to extraction. This extraction method usually results in recoveries greater than 90 % (*cf.* 5,10,12). The following extraction procedure was **tested and validated for human EDTA plasma** samples. If other specimens are used, it is recommended to validate the extraction recovery using a ¹²⁵I-Angiotensin II-spiked specimen (e.g. 1 ml of specimen spiked with 50 µl of ¹²⁵I-Angiotensin II).

Extraction Procedure Using Vacuum Manifold

With the help of negative pressure the fluids will be passed through the column. The procedure is the same as described in the Extraction procedure using centrifugation (see below).

The following flow rates should be used:

Sample application and elution should be done with a flow rate of 2 ml/min

All the other fluids can pass the column with a flow rate of 5 ml/min.

Extraction Procedure using Centrifugation

COLUMN PREPARATION AND CONDITIONING

- Mark one extraction column for each sample to be extracted and place into polypropylene centrifugation tubes.
- Add 2x 1 ml of methanol to columns and centrifuge for 1 minute at 200 x g.

Note: Empty tubes to avoid tips of extraction columns from contacting eluates.

- Add 2x 1 ml of distilled or deionized water to columns, centrifuge for 1 minute at 200 x g.
- Proceed with sample application without delay.

SAMPLE APPLICATION

- Load 2x 0.6 ml of EDTA plasma sample onto the correspondingly marked column and centrifuge for 1 minute at 200 x g.

Note: If the EDTA plasma sample is highly viscous, repeat centrifugation for 1 minute at 1000 x g.

WASHING

- Add 1 ml of distilled or deionized water to columns, centrifuge for 1 minute at 500 x g.

Note: If the column is clogged, repeat centrifugation for 1 minute at 1000 x g.

ELUTION OF EXTRACT

- Place each extraction column into a clean correspondingly marked polypropylene tube.
- Add 1 ml of methanol to columns and centrifuge for 1 minute at 200 x g.
- **Collect the eluate and keep it for the evaporation step.**
- Wash column with 2x 1 ml of methanol. Discard the eluted wash solution
- Use column for extracting the next sample (up to 5 times) or store column at 18-28°C and protected from light and dust.

EVAPORATION AND RECONSTITUTION OF EXTRACT

- Evaporate the methanol to dryness using a vacuum concentrator with a cold trap. Alternatively, evaporate the methanol to dryness with a stream of particle free nitrogen.
- Reconstitute the samples with 1.2 ml of Tris buffer and vortex thoroughly.
- Equilibrate the extracts for at least 30 minutes at 2-8°C and vortex again.
- Store reconstituted extracts capped and frozen at -20°C if not assayed immediately.

ASSAY PROCEDURE

Note: Keep assay tubes and reagent vials in an ice bath (0-4°C) during all pipetting steps.

1. Label 8 tubes in duplicate: A to E for the calibrators, NSB for the blank, MB for the maximum binding and T for the total activity tubes. Label additional tubes in duplicate for patient samples and controls.
2. Pipet 600 µl of Tris Buffer into the NSB tubes, and 500 µl of Tris Buffer into the MB tubes.
Pipet 500 µl of the reconstituted Calibrators A to E into the corresponding tubes.
Pipet 500 µl of the extracted patient samples and reconstituted controls into each of the correspondingly marked tubes.
3. Add 100 µl of the Ang II Antiserum to all tubes except the NSB and T tubes. Vortex.
4. Incubate all tubes for 16 hours (+ 4 hours) at 2-8°C.
5. Add 100 µl of ¹²⁵I-Ang II tracer to all tubes. Vortex. Remove the T tubes, they will require no further processing until counting in step 11.
6. Incubate for 6 hours (± 30 minutes) at 2-8°C.
7. Invert the bottle containing the solid phase second antibody several times, add a stir bar and place the bottle on a magnetic stirrer.
While stirring the second antibody suspension continuously, add 100 µl of the suspension to all assay tubes (except the T tubes). Vortex.
8. Incubate for 30 minutes (± 5 minutes) at 2-8°C.
9. Add 1 ml of distilled or deionized water to all tubes (except T tubes).
10. Centrifuge for 5 minutes at 1000 x g and 2-8°C
(*In order to obtain a compact pellet, a centrifugation at 2000-3000 x g during 15 minutes is recommended*).
Aspirate the supernatants (except the T tubes) and retain the precipitates for counting.
11. Count the tubes for 1 minute in a gamma-counter.

RESULTS & Standardization

Record the cpm for all tubes (T, NSB, MB, Calibrators A-E, samples and Controls) and calculate the mean cpm for each pair of tubes. Subtract the mean assay blank (NSB tubes) from the respective mean of each pair of tubes:

$$\text{Net cpm} = \text{cpm}_{\text{Average}} - \text{cpm}_{\text{Average NSB}}$$

Calculate the binding of each pair of tubes as a percent of maximum binding (MB tubes), with the NSB-corrected cpm of the MB tubes taken as 100%.

$$B/B_0(\%) = \text{percentbound} = \frac{\text{netcpm}}{\text{netMBcpm}} \times 100$$

Prepare a lin/log graph paper and plot the percent bound on the vertical axis against the Ang II concentration (pg/ml) on the horizontal axis for each of the Calibrators. Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a four parameter algorithm. Determine Ang II concentrations for the patient samples and Controls from this standard curve. Alternative data reduction methods are equally acceptable.

See Table 11 and Figure 1 for examples of results and standard curve. *These results and standard curve is for*

demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed

The Calibrators are calibrated against WHO reference preparation MRC70/302.

QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this instruction for use is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following this instruction for use.

Ang II is presently not included in any external QC schemes. Therefore, each laboratory should establish its own reference values in addition to the use of an internal control.

The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the QC Data Sheet added to the kit.

If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) expiration dates of reagents iii) storage and incubation conditions iv) purity of water.

LIMITATIONS

- Patient samples that are not properly handled, may cause inaccurate Angiotensin II results. EDTA venipuncture tubes are essential to inhibit ACE activity and the subsequent formation of Ang II from Ang I. An angiotensinase inhibitor, such as Bestatin (code: B-A22-BST), is highly recommended to inhibit the transformation of Ang II to Ang III.
- Freezing plasma samples immediately or extracting plasma samples without delay, will preserve the integrity of the Ang II concentration at the time of sampling.
- The interpretation of the results should be examined regarding eventual differences in immunoreactive peptides and biologically active Angiotensin II (2,11).
- Test results should be interpreted in conjunction with information available from clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.
- Some plasma samples may clog extraction columns. Therefore, to clear plasma samples of substances that could interfere with flow rate of the extraction column. It is recommended to centrifuge thawed plasma samples for 1 minute at 10,000 x g and 2-8°C or, alternatively, for 5 minutes at 1000 x g, then proceed to pipet samples onto columns.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The assay performance characteristics have been validated in duplicates.

Intra-Assay Precision (Within-Run): 8.3%. The intra-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values from four extracted plasma samples in a single run. The values are presented in Table 12.

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 11.5%. Three plasma samples were freshly extracted each time an assay was performed. The inter-assay precision of the samples was then determined from the results of 20 pairs of values in 20 consecutive runs. The values are presented in Table 13.

Detection limit (LoB): 1.0 pg/ml. Twenty Zero Calibrator duplicates (Tris Buffer) were assayed in a single run. The minimal detectable dose of Ang II was calculated by subtracting two standard deviations (SD) from the mean cpm of the maximum binding and intersecting this value with the standard curve obtained in the same run.

Dilution Linearity/Parallelism: 93.5%. Two human plasma samples containing high concentrations of Ang II were diluted

with a pool of Ang II-free human plasma, extracted and subsequently analyzed according to the assay procedure. The values are presented in Table 14.

Spiking Recovery: 99.2%. In the first set of experiments, six plasma samples (4-9) were spiked with different amounts of Ang II, then extracted and analyzed according to the assay procedure. In the second set of experiments, two plasma samples (A and B) were extracted, spiked with 2.5 to 100 pg/ml of Ang II and then assayed according to the assay procedure. The results are presented in Table 15.

Specificity: The cross-reactions of the Ang II antiserum presented in Figure 2 were determined at 50 % binding.

Method Comparison: 46 patients samples were analyzed using the BÜHLMANN Angiotensin II RIA and a commercially available kit for determining plasma renin activity (PRA). A linear regression analysis of the results is presented in Figure 3. The range of values was 0.3 - 81.8 pg/ml for Ang II and 0.1-16.3 ng/ml/hour for PRA, respectively (12).

REFERENCE INTERVALS

In two studies using EDTA plasma samples from 123 apparently healthy donors, the following reference ranges were established (5,12):

These reference ranges should be used as guidelines only. It is recommended that each laboratory establishes its own expected range for its patient population.

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Der Bühlmann Angiotensin II RIA ist ein Doppel-Antikörper Radioimmun-Assay für den quantitativen *in vitro* diagnostischen Nachweis von Immunreaktivem Angiotensin II (Ang II) in extrahiertem EDTA Plasma.

PRINZIP DER METHODE

Der Bühlmann Angiotensin II Radioimmun-Assay misst immunreaktives Ang II mittels einer modifizierten Methode nach Emanuel *et al.* (1). Extrahierte EDTA Plasmaproben, sowie Kalibratoren und Kontrollen werden zuerst zusammen mit einem Anti-Ang II Antikörper (Ak) für 16 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von ¹²⁵I-Ang II konkurriert dieses in einem zweiten Inkubationsschritt von 6 Stunden, mit dem, in den Proben, Kalibratoren oder Kontrollen vorhandenen Ang II um die vorhandenen Antikörper Bindungsstellen. Danach wird ein 2. Antikörper zugegeben, welcher an eine feste Phase (Zellulose) gebunden ist. Die Antikörper-gebundene Fraktion wird präzipitiert und in einem Gamma-Counter gezählt.

Es wird empfohlen während der Probengewinnung, die Proben mit Bestatin oder einem äquivalenten Angiotensinase Inhibitor zu behandeln, um die Degradation von Ang II zu verhindern (5-8; siehe auch Probengewinnung und Lagerung).

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

| Reagenz | Menge | Art.-Nr. | Rekonstitution |
|---|---------------------|--------------|--------------------------------|
| Extraktionssäulen (1 ml) Phenylsilylsilica Säulen "reversed phase" | 10 Stück | B-AEC | |
| Tris-Puffer | 1 Flasche 100 ml | B-A22-TB | Gebrauchsfertig |
| Antiserum Kaninchen Anti-Ang II Ak | 1 Flasche 10 ml | B-A22-AS | Gebrauchsfertig |
| Tracer ¹²⁵ I-Ang II | 1 Flasche 11 ml | B-A22-TR | Gebrauchsfertig |
| Kalibratoren¹⁾ lyoph. synthetisches Ang II | 5 Flaschen | B-A22-CASET | mit je 5 ml Tris-Puffer lösen. |
| Kontrollen normal / hoch²⁾ lyoph. Ang II in Puffermatrix | 2 Flaschen | B-A22-CONSET | Mit je 5 ml Tris-Puffer lösen |
| 2. Antikörper Zellulose gebundener Anti-Kaninchen Ak | 1 Flasche 11 ml | B-AB2 | Gebrauchsfertig |

Tabelle 3

¹⁾ Die Kalibratorenlösungen enthalten nach der Rekonstitution 2, 5, 20, 100, und 500 pg/ml Ang II.

²⁾ Für Lot-spezifische Ang II Konzentration siehe QC Datenblatt.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

| Ungeöffnete Reagenzien | |
|---|---|
| Die Säulen sollten bei 18-28°C gelagert werden. Alle anderen Kitreagenzien sind bei 2-8°C stabil. Nach Ablauf des Verfalldatums nicht mehr verwenden. Den 2. Antikörper nicht einfrieren. | |
| Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien | |
| Extraktionssäulen | Gebrauchte Säulen müssen vor Licht und Staub geschützt bei 18-28°C gelagert werden. |
| Tris-Puffer | |
| Antiserum | Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar. |
| Tracer | |
| Kalibratoren | |
| Kontrollen | Bei -20°C für mind. 2 Monate haltbar. |
| 2. Antikörper | Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar. (nicht einfrieren!) |

Tabelle 4

VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Radioaktives Material: Der Kit enthält radioaktives Material (¹²⁵Jod) von weniger als 56 kBq.
- Der Erwerb, sowie der Gebrauch von radioaktivem Material muss entsprechend der landesspezifischen Bestimmungen erfolgen. Wir empfehlen, dass Sie sich über die lokalen Bestimmungen Ihres Landes bezüglich der Vorsichtsmaßnahmen beim Gebrauch und der

Entsorgung von Kitreagenzien, radioaktivem Material und Patientenproben informieren.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- Lesen Sie die Arbeitsanleitung sorgfältig vor der Testdurchführung. Die Testqualität kann negativ beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder verändert werden sowie nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- Falsche Resultate für die Standardkurve, Kontrollen oder Proben können entstehen, wenn der 2. Antikörper vor der Zugabe nicht ausreichend gemischt wurde. 2. Antikörper nicht einfrieren!
- Die Reagenzien dürfen nicht nach dem Verfallsdatum verwendet werden, das auf den Etiketten angegeben ist.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Lots.
- Lassen Sie die Reagenzien auf Raumtemperatur äquilibrieren. Lösen Sie lyophilisierte Reagenzien wie angegeben auf. Reagenzien vor Gebrauch gut mischen (vortexen).
- Die Zählzeit sollte so gewählt werden, dass der statische Zählfehler klein ist. Bei 2000 cpm ist der Zählfehler bei 5%; bei 10000 cpm nur noch 1%.
- Falls die Konzentration einer unbekannt Probe höher als der höchste Kalibrator ist, muss die Probe mit Tris-Puffer weiter verdünnt und noch einmal getestet werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 100 µl, 250 µl, 400 µl und 1000 µl Präzisionspipetten mit Einwegspitzen.
- 5.0 ml volumetrische Pipette.
- Einweg Polypropylenröhrchen (13x100 mm) für die Vorbereitung der Plasma-Extrakte
- Konische Einweg Polystyrenröhrchen für die Testdurchführung (z.B. Sarstedt Art.-Nr. 57.477).
- Vakuumpumpe zum Gebrauch für die Extraktionssäulen (optional).
- Methanol p.a. (z.B. Merck Art.-Nr. 6009).
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser.
- Bestatinlösung¹⁾ für die Probengewinnung (optional)
- Eisbad
- gekühlte Zentrifuge.
- Vortex Schüttler.
- Magnetrührer mit Rührstab.
- Aspirationsvorrichtung.
- Vakuumkonzentrator oder Heizblock mit N₂ Begasung.
- Gammastrahlungszähler (Gamma-Counter).

¹⁾ Das Bestatin Reagenz ist auf Anfrage bei Bühlmann erhältlich (Art.-Nr. B-A22-BST).

PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG

Für die Testdurchführung in Doppelansätzen werden 1.2 ml EDTA Plasma gebraucht. Eine korrekte Probengewinnung ist essentiell, um verlässliche Resultate zu erzielen. Hämolytierte, stark ikterische oder lipämische Proben können die Resultate beeinflussen.

Empfohlene Probengewinnung: Es ist wichtig zu verhindern, daß Ang I und Ang II durch Angiotensinogen und Ang I durch Renin und ACE *in vitro* gebildet werden. Ebenfalls muß die *in vitro* Degradation von Ang II zu Ang III durch Angiotensinasen verhindert werden. Die *in vitro* Generation und Degradation von Ang II kann minimiert werden, indem folgende Punkte befolgt werden:

Gewinnung: Von einem **liegenden** Patienten werden 5 ml Blut in einem vorgekühlten EDTA Blutabnahmeröhrchen oder Plastikspritze gesammelt. Unmittelbar danach werden 100 µl Bestatin-Lösung (siehe oben) oder ein äquivalenter Angiotensinase Inhibitor (*cf.* 5,7-9) pro 5 ml EDTA-Blut zugeben. Die Proben danach direkt in ein Eisbad stellen und innerhalb von einer Stunde mit der Plasma Trennung fortfahren.

Plasmatrengung: Die Proben für 5 Minuten bei 2-8°C und 1000 x g zentrifugieren und das Plasma von den Zellen trennen. Die Proben in Polypropylenröhrchen aliquotieren und bei -20°C einfrieren oder unmittelbar mit der Extraktion beginnen.

Alternative Probengewinnung: Von einem **liegenden** Patienten werden 5 ml Blut in einem vorgekühlten EDTA Blutentnahmeröhrchen oder Plastikspritze gesammelt und unmittelbar danach auf Eis gestellt. Direkt nach der Probengewinnung für 5 Minuten bei 2-8°C und 1000 x g zentrifugieren und das Plasma von den Zellen trennen. Die Proben in Polypropylenröhrchen aliquotieren und bei -20°C einfrieren oder direkt mit der Extraktion beginnen.

SÄULENEXTRAKTION DER PLASMA PROBEN

Die Verwendung einer "reversed-phase" Extraktionsmethode ist entscheidend, um verlässliche Resultate zu erhalten. Die beste Wiederfindung wurde mit Phenylsilylsilica Extraktions-säulen beobachtet (2-5). Die im Kit enthaltenen Extraktionssäulen **können bis zu fünfmal verwendet werden**, falls diese entsprechend der Arbeitsanleitung angewandt werden. Gebrauchte Säulen müssen vor Licht und Staub geschützt, bei 18-28 °C gelagert werden. Um ein Verstopfen der Säulen zu verhindern, müssen Proben, welche feste Partikel (z.B. Fibrin) enthalten, **vor der Extraktion gefiltert oder zentrifugiert werden**. Diese Extraktionsmethode resultiert in einer Wiederfindung von >90% (siehe 5,10,12). Die folgende **Extraktion wurde für humanes EDTA-Plasma getestet und validiert**. Falls EDTA-Plasma von Tieren gemessen werden soll, wird empfohlen die Extraktionswiederfindung mit ¹²⁵I-Ang II versetzten Proben auszutesten (z.B. 1 ml Probe mit 50 µl ¹²⁵I-Ang II versetzt).

Säulenextraktion mit Vakuumpumpe

Bei der Säulenextraktion mit Hilfe einer Vakuumpumpe (die Flüssigkeit wird durch Unterdruck durch die Säulen gesaugt) wird analog der Zentrifugations-Methode verfahren (siehe unten). Folgenden Durchflußraten sind hierbei zu beachten:

- Auftragen der Probe und Eluieren des Extrakts sollten bei 2 ml/min erfolgen.
- Alle weiteren Flüssigkeiten können mit 5 ml/min die Säulen passieren.

Extraktion mit Zentrifugation

SÄULENPRÄPARATION

- Pro Patientenplasma eine Säule beschriften, Säule in ein Polypropylen-Zentrifugenröhrchen stellen.
- Säulen durch Zugabe von je 2x 1 ml Methanol aktivieren, 1 Minute bei 2-8°C und 200 x g zentrifugieren.

Hinweis: Die Röhrchen müssen zwischendrin entleert werden, um den Kontakt des Eluats an den Säulen zu verhindern

- 2x 1 ml destilliertes Wasser auf jede Säule geben, 1 Minute bei 2-8°C und 200 x g zentrifugieren.

AUFTRAGEN DER PROBEN

- Nach der Zentrifugation sofort je 2x 0.6 ml gekühltes EDTA-Plasma auf die entsprechend beschriftete Säule geben, 1 Minute bei 2-8°C und 200 x g zentrifugieren.

Hinweis: Falls das EDTA-Plasma sehr viskös ist, soll die Zentrifugation für 1 Minute bei 1000 x g wiederholt werden.

WASCHEN

- Auf jede Säule 1 ml destilliertes Wasser geben, 1 Minute bei 2-8°C und 500 x g zentrifugieren.

Hinweis: Falls die Säule verstopft ist, soll die Zentrifugation für 1 Minute bei 1000 x g wiederholt werden.

ELUIEREN DES EXTRAKTS

- Jede Säule in ein frisches entsprechend beschriftetes Polypropylen-Zentrifugenröhrchen stellen.
- 1 ml Methanol auf jede Säule geben, 1 Minute bei 200 x g zentrifugieren.
- **Das Eluat für die Evaporation aufbewahren.**
- Die Säulen mit 2x 1 ml Methanol waschen und die eluierte Waschlösung verwerfen.

EVAPORATION UND RECONSTITUTION DES EXTRAKTS

- Das Methanol-Eluat zum Trocknen eindampfen (Begasung mit partikelfreiem Stickstoff oder Vakuum-Konzentrator)
- Die Extrakte mit 1.2 ml Tris-Puffer lösen und gut vortexen.
- Die gelösten Extrakte für mindestens 30 Minuten bei 2-8 °C stehen lassen
- Falls die Proben nicht direkt gemessen werden, müssen diese verschlossen bei -20 °C gelagert werden.

ARBEITSANLEITUNG

Hinweis: Die Teströhrchen und Reagenzien müssen während sämtlichen Pipetierschritten im Eisbad sein.

1. Acht Röhrchen im Doppel beschriften: Kalibratoren A-E, NSB (Blank), MB (maximale Bindung) und T (totale Aktivität). Zusätzliche Röhrchen für die Kontrollen und Plasmaproben im Doppel beschriften.
2. 600 µl Tris-Puffer in das NSB und 500 µl in das MB Röhrchen geben.
500 µl gelöste Kalibratoren A bis E in die entsprechenden Röhrchen geben.
500 µl extrahierte Patientenproben und gelöste Kontrollen in die entsprechend beschrifteten Röhrchen geben.
3. 100 µl Ang II-Antiserum zu allen Röhrchen geben, ausser ins NSB- und T-Röhrchen, vortexen.
4. Alle Röhrchen für 16±4 Stunden bei 2-8 °C inkubieren.
5. 100 µl ¹²⁵I-Ang II Tracer zu allen Röhrchen geben, vortexen. T-Röhrchen bis zum Schritt 11 zur Seite legen.
6. Für weitere 6 Stunden (±30 Min) bei 2-8 °C inkubieren.
7. Den 2. Antikörper (feste Phase) mehrmals invertieren, einen Rührstab hineingeben und auf einen Magnetrührer stellen. Unter Rühren werden je 100 µl des 2. Antikörpers zu sämtlichen Probenröhrchen (außer T-Röhrchen) zugegeben, vortexen.
8. Für 30±5 Minuten bei 2-8 °C inkubieren.
9. 1 ml destilliertes Wasser zu allen Röhrchen (ausser T-Röhrchen) zugeben.

10. Für 5 Minuten bei 2-8 °C und 1000 x g zentrifugieren.
(Um ein kompaktes Pellet zu erhalten wird eine Zentrifugation von 2-3000 x g während 15 Minuten empfohlen)
Den Überstand absaugen (außer T-Röhrchen) und das Präzipitat für die Zählung zurückbehalten.
11. Alle Röhrchen für 1 Minute in einem Gamma-Counter zählen.

RESULTATE & STANDARDISIERUNG

Für alle Röhrchen werden im Gammazähler die cpm bestimmt (T, NSB, MB, Kalibratoren A-E, Proben und Kontrollen) und die entsprechenden Mittelwerte ermittelt. Der Mittelwert vom Blank (NSB) wird von den anderen Mittelwerten subtrahiert.

$$\text{Netto cpm} = \text{cpm}_{\text{Mittelwert}} - \text{cpm}_{\text{Mittelwert NSB}}$$

Die Bindung (%) der Kalibratoren und Proben wird errechnet als Quotient des jeweiligen Mittelwertes (cpm) zum MB (cpm).

$$\% \text{ Bindung} = \frac{\text{netto cpm}}{\text{netto MB cpm}} \times 100$$

Auf einem halblogarithmischen (lin/log) Papier wird auf der vertikalen Achse die Bindung in Prozent und auf der horizontalen Achse die Ang II-Konzentration der Kalibratoren (pg/ml) aufgetragen. Die beste passende Kurve durch die Punkte zeichnen oder mit einem entsprechenden Computerprogramm eine vier Parameter Analyse anwenden.

Die Ang II-Konzentrationen der Patientenproben und der Kontrollen aus der erstellten Standardkurve herauslesen. Alternative Datenverdichtungsmethoden können ebenfalls verwendet werden.

Für ein Zahlenbeispiel und eine Standardkurve siehe Table 11 und Figure 1. Diese Standardkurve ist nur zu Anschauungszwecken dargestellt. Eine Standardkurve muß für jedes zu testende Probenet erstellt werden.

Die Kalibratoren sind gegen die WHO Referenzpräparation MRC70/302 kalibriert.

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Testpackungsbeilage ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur erreicht durch die Anwendung „Guter Laborpraxis“ (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Arbeitsanleitung.

Ang II ist in keinem QC Schema enthalten und sollte deshalb durch interne Kontrollen jedes einzelnen Labors validiert werden. Die Reproduzierbarkeit der Eichkurvenparameter und der Kontrollwerte sollte innerhalb des etablierten Erwartungsbereiches liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem zusätzlichen QC-Datenblatt angegeben. Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich liegen. Falls die Präzision des Testes nicht mit dem etablierten Erwartungsbereich übereinstimmt und wiederholte Messungen ein technisches Problem ausschließen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipettierung, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, ii) Verfallsdaten der Reagenzien, iii) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, iv) Wasserreinheit.

LEISTUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

- Patientenproben, welche nicht korrekt gehandhabt werden können zu falschen Resultaten führen. EDTA Blutabnahmeröhrchen sind essentiell um die ACE Aktivität und die daraus folgenden Katalyse von Ang I zu Ang II zu inhibieren. Die Anwendung eines Angiotensinase Inhibitors, wie z.B. Bestatin (Art.-Nr. B-A22-BST) wird dringend

empfohlen um die Degradation von Ang II zu Ang III zu verhindern.

- Direktes Einfrieren der Plasmaproben hilft die vollständige Ang II Konzentration zum Entnahmezeitpunkt zu erhalten.
- Die Interpretation der Resultate sollte unter Einbezug möglicher Unterschiede von Immunreaktiven Peptiden und biologisch aktivem Ang II erfolgen (2,11).
- Die Testergebnisse sollten stets in Verbindung mit zusätzlichen Informationen aus der Anamnese des Patienten und weiteren diagnostischen Verfahren bewertet werden.
- Einige Plasmaproben können die Extraktionssäulen verstopfen. Um Plasmaproben von Schwebeteilchen zu befreien sollten aufgetaute Proben für 1 Minute bei 10`000 x g oder für 5 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsmerkmale wurden in Doppelbestimmungen ermittelt.

Intra-Assay Präzision: 8.3%. Die Intra-Assay Präzision wurde aus 20 Doppelbestimmungen von vier Plasmaproben im gleichen Testansatz berechnet. Die Resultate sind in Table 12 dargestellt.

Inter-Assay Präzision: 11.5%. Drei Plasmaproben wurden bei jedem Testansatz frisch extrahiert. Die Inter-Assay Präzision wurde in 20 aufeinanderfolgenden Doppelansätzen bestimmt. Die Resultate sind in Table 13 dargestellt.

Nachweisgrenze: (LoB): 1.0 pg/ml. Zwanzig MB Röhrchen (Tris-Puffer) wurden im gleichen Testlauf im Doppel gemessen. Vom MB Mittelwert (cpm) wurden 2 Standardabweichungen subtrahiert und durch Intersektion in der, im gleichen Ansatz erhaltenen Standardkurve wurde die minimale nachweisbare Menge Ang II berechnet.

Verdünnungslinearität: 93.3%. Zwei humane Plasmaproben mit hohen Ang II Konzentrationen wurden mit einem Ang II freien human Plasma-Pool seriell verdünnt, extrahiert und anschliessend entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die Resultate sind in Table 14 angegeben.

Wiederfindung: 99.2%. In einem ersten Teil wurden sechs Plasmaproben mit unterschiedlichen Mengen Ang II versetzt, extrahiert und entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. In einem zweiten Teil wurden zwei Plasma Proben extrahiert, mit aufsteigenden Mengen Ang II (2.5-100 pg/ml) versetzt und anschliessend entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die Resultate sind in Table 15 dargestellt.

Spezifität: Die Kreuzreaktivität des Ang II Antiserums wurden bei einer 50% Bindung mit verschiedenen Reagenzien bestimmt und in Figure 2 dargestellt.

Methodenvergleich: 46 Patientenproben wurden mit dem Bühlmann Angiotensin II RIA und mit einem kommerziell erhältlichen Kit für die Bestimmung der Plasma Renin Aktivität (PRA) gemessen. Eine lineare Regressionsanalyse der Resultate ist in Figure 3 dargestellt. Die Ang II Werte liegen in einem Bereich von „nicht nachweisbar“ bis 81.8 pg/ml und für PRA zwischen 0.1 und 16.3 ng/ml/Stunde (12).

REFERENZINTERVALLE

In zwei Studien mit 123 EDTA-Plasmaproben von normalen Blutspendern wurden Referenzbereiche etabliert, die in Table 16 dargestellt sind (5,12).

Diese Bereiche sollen nur als Richtwerte dienen und müssen von jedem Labor selbst etabliert werden.

UTILISATION

La trousse de dosage de l'angiotensine II BÜHLMANN est un radioimmunoessai à double anticorps destiné à la détermination diagnostique quantitative *in vitro* de l'angiotensine immunoréactive dans le plasma EDTA après extraction.

PRINCIPE DU DOSAGE

Ce radioimmunoessai des Laboratoires BÜHLMANN permet de mesurer l'angiotensine II (Ang II) immunoréactive au moyen d'un RIA à double anticorps faisant appel à la méthode modifiée de Emanuel *et al.* (1). Après extraction, les échantillons, les calibrateurs et les contrôles sont préalablement préincubés durant 16 heures avec un anticorps anti-Ang II. Le marqueur radioactif ^{125}I -Ang II est ajouté. Il est en compétition avec l'angiotensine II présente dans les échantillons, les calibrateurs et les contrôles, pour les mêmes sites de liaison, au cours d'une seconde incubation de 6 heures. Après cette incubation, un second anticorps en phase solide est ajouté au mélange. La fraction liée à l'anticorps est précipitée puis la radioactivité est mesurée au moyen d'un compteur-gamma.

Il est recommandé de traiter les échantillons de plasma avec de la Bestatine ou un autre inhibiteur d'angiotensinase, au moment du prélèvement, afin d'éviter la dégradation de l'Ang II. (5-8 ; cf. également « Prélèvement et Conservation des échantillons »).

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

| Réactifs | Quantité | Code | Reconstitution |
|---|--------------------|-------------|---|
| Colonnes d'extraction (1 ml) Phénylsilylsilicate pour extraction en phase inverse. | 10 pièces | B-AEC | |
| Tampon Tris | 1 flacon 100 ml | B-A22-TB | Prêt à l'emploi |
| Antisérum de lapin anti-Ang II | 1 flacon 10 ml | B-A22-AS | Prêt à l'emploi |
| Marqueur radioactif ^{125}I -Ang II | 1 flacon 11 ml | B-A22-TR | Prêt à l'emploi |
| Calibrateurs¹⁾ Ang II synthétique lyophilisée | 5 flacons | B-A22-CASET | Reconstituer chaque flacon avec 5 ml de tampon Tris |

| | | | |
|---|-------------------|--------------|---|
| Contrôles Normal / Elevé²⁾ Ang II lyoph. dans une matrice tamponnée | 2 flacons | B-A22-CONSET | Reconstituer chaque flacon avec 5 ml de tampon Tris |
| Second Anticorps Second anticorps anti-lapin en phase solide | 1 flacon 11 ml | B-A22-AB2 | Prêt à l'emploi |

Table 5

¹⁾ Après reconstitution, les calibrateurs présenteront respectivement les concentrations suivantes: 2, 5, 20, 100 et 500 pg/ml d'Ang II.

²⁾ Cf. voir QC pour les concentrations d'Ang II spécifiques à chaque lot.

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

| Réactifs fermés | |
|--|--|
| Les colonnes doivent être conservées à 18-28°C. Tous les autres composants de la trousse sont stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur les étiquettes. | |
| Réactifs ouverts/ reconstitués | |
| Colonnes d'extraction | Les colonnes usagées doivent être conservées à 18-28°C et protégées de la lumière et de la poussière |
| Tampon Tris | Stables à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur les étiquettes |
| Antisérum | |
| Marqueur radioactif | |
| Calibrateurs | Stable durant au moins 2 mois après reconstitution à -20°C. |
| Contrôles | |
| Second anticorps | A conserver réfrigéré (Ne pas congeler !) Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette |

Table 6

PRECAUTIONS

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

- Matériel radioactif: cette trousse contient des substances radioactives dont la radioactivité n'excède pas 56 kBq d' ^{125}I .
- La réception, l'acquisition, la possession, l'utilisation et le transfert de substances radioactives ne doivent se faire qu'en respectant la réglementation de chaque pays. Nous conseillons vivement à tous les utilisateurs de s'adresser aux autorités locales afin d'obtenir les directives précises concernant l'utilisation des réactifs contenus dans la trousse et la gestion des déchets radioactifs et biologiques (échantillons analysés).

PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Le test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte ou de modification des réactifs, ou de stockage dans des conditions autres que celles détaillées dans le présent mode d'emploi.
- L'homogénéisation de la suspension du second anticorps est essentielle pour éviter des résultats erronés. **Ne pas congeler le second anticorps.**
- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Laisser les réactifs équilibrer à la température ambiante. Reconstituer les réactifs lyophilisés comme indiqué. Bien mélanger (au vortex) les réactifs avant utilisation.
- Le temps de comptage devrait être suffisant de manière à éviter des erreurs statistiques (ex. au comptage de 2000 cpm correspond une marge d'erreur de 5%; le comptage de 10000 induit une marge d'erreur de 1%).
- Si les résultats obtenus sont supérieurs au calibrateur le plus concentré, il convient de procéder à la dilution de l'échantillon avec le tampon tris préalablement à un nouveau dosage.

MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 100, 500, 1000 et 5000 µl.
- Tubes jetables en polypropylène (13 x 100 mm) pour la préparation des extraits.
- Tubes coniques jetables pour RIA en polystyrène (*par ex.* tubes coniques Sarstedt; n° 57.477)
- Pompe à extraction sous vide pour les colonnes (en option)
- Méthanol (**qualité HPLC**)
- Eau doublement distillée déionisée
- Solution de Bestatine¹⁾ pour le prélèvement des échantillons (en option)
- Bain de glace
- Centrifugeuse réfrigérée
- Vortex
- Agitateur magnétique et support
- Système d'aspiration
- Evaporateur
- Compteur – Gamma

¹⁾ Le réactif de Bestatine peut être commandé séparément (code de commande: B-A22-BST).

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

La procédure requiert 1.2 ml de plasma EDTA pour une détermination en double. Un prélèvement conforme est indispensable à l'obtention de résultats de dosage pertinents. Des échantillons hémolysés, fortement ictériques ou lipémiques risquent d'induire des résultats erronés.

Procédure de prélèvement recommandée : il est important de prévenir la formation *in vitro* d'Ang I et d'Ang II à partir d'angiotensinogène et d'Ang I, respectivement par la rénine et l'enzyme de conversion de l'angiotensine, aussi bien que la dégradation *in vitro* d'Ang II en Ang III par les angiotensinases. La formation et la dégradation *in vitro* de l'Ang II peuvent être minimisées au moyen de la procédure de prélèvement suivante:

Prélèvement : Collecter 5 ml de sang chez un patient au repos dans un tube EDTA pour ponction veineuse préalablement refroidi ou une seringue en plastique. Ajouter sans attendre 100 µl de solution de Bestatine prête à l'emploi (cf. ci-dessus) ou un inhibiteur de l'angiotensinase équivalent (cf. 5,7-9) pour 5 ml de plasma EDTA. Placer immédiatement l'échantillon sur un lit de glace et procéder à la séparation du plasma **dans l'heure**.

Séparation : Centrifuger les échantillons durant 15 minutes à 1000 x g et 2-8°C, séparer le plasma des cellules, aliquoter et congeler les échantillons sans attendre dans des tubes en polypropylène à -20°C au minimum ou procéder immédiatement à l'extraction.

Procédure de prélèvement alternative : Collecter 5 ml de sang chez un patient au repos dans un tube EDTA pour ponction veineuse préalablement refroidi ou une seringue en plastique et placer immédiatement les échantillons sur un lit de glace. Centrifuger à 1000 x g et 2-8°C **immédiatement** après le prélèvement. Séparer le plasma des cellules, aliquoter et congeler les échantillons sans attendre dans des tubes en polypropylène à -20°C au minimum ou procéder immédiatement à l'extraction.

EXTRACTION DES ECHANTILLONS

L'utilisation d'une méthode d'extraction en phase inverse est essentielle à l'obtention de résultats pertinents. Le meilleur rendement a été obtenu en utilisant des colonnes avec du phénylsilylsilicate (cf. 2-5). **Chaque colonne d'extraction fournie dans cette trousse peut être utilisée jusqu'à 5 fois**, en respectant la procédure d'extraction qui suit. Les colonnes utilisées doivent être conservées à 18-28°C, à l'abri de la lumière et de la poussière. Afin d'éviter l'obturation des colonnes, **il convient de filtrer ou de centrifuger les échantillons présentant des particules** en solution telles que le fibrinogène, préalablement à l'extraction. Cette méthode d'extraction permet généralement l'obtention de rendements supérieurs à 90 % (cf. 5,10,12). Elle est **testée et validée pour les échantillons de plasma EDTA humains**. L'utilisation d'échantillons d'un autre type devra être préalablement validée en déterminant le rendement d'extraction par addition ¹²⁵I-angiotensine II aux échantillons (par ex : 1 ml d'échantillon additionné de 50 µl de ¹²⁵I-Angiotensine II).

Procédure d'extraction sous vide :

Grâce à la pression négative exercée, les fluides passeront au travers de la colonne. Cette procédure est identique à celle par centrifugation décrite ci-dessous.

Il convient de faire passer le solvant au travers de la colonne à la vitesse de ≤ 5ml/min pour tous les fluides, à l'exception des échantillons qui devront passer à la vitesse de 2 ml/min.

Procédure d'Extraction par centrifugation

PREPARATION DES COLONNES ET CONDITIONNEMENT :

Identifier une colonne par échantillon à extraire et la placer dans un tube à centrifugation en polypropylène.

- Ajouter 2x 1 ml de méthanol aux colonnes et les centrifuger durant 1 minute à 200 x g.

Note : Vider les tubes afin d'éviter que les pointes des colonnes n'entrent en contact avec les éluats.

- Ajouter 2x 1 ml d'eau distillée ou déionisée aux colonnes et les centrifuger durant 1 minute à 200 x g.

Procéder à l'application des échantillons sans attendre.

APPLICATION DES ECHANTILLONS:

- Charger 2x 0.6 ml de plasma EDTA sur les colonnes correspondantes et préalablement marquées puis les centrifuger durant 1 minute à 200 x g.

Note : Si les échantillons de plasma EDTA sont fortement visqueux, répéter la centrifugation pendant 1 minute à 1000 x g.

LAVAGE:

- Ajouter 1 ml d'eau distillée ou déionisée aux colonnes, centrifuger pendant 1 minute et à 500 x g.

Note : Si la colonne est obstruée, répéter la centrifugation pendant 1 minute à 1000 x g.

ELUTION DES EXTRAITS:

- Placer chaque colonne dans le tube en polypropylène propre correspondant et préalablement marqué.

- Ajouter 1 ml de méthanol aux colonnes puis centrifuger durant 1 minute à 200 x g.

- **Conservé les éluats jusqu'à l'étape d'évaporation.**

- Laver les colonnes avec 2x 1 ml of méthanol. Jeter la solution de lavage utilisée.

- Utiliser la colonne pour l'extraction de l'échantillon suivant (Jusqu'à 5 fois) ou conserver la à 18-28°C à l'abri de la lumière et de la poussière.

EVAPORATION ET RECONSTITUTION DES EXTRAITS

- Evaporer le méthanol jusqu'à assèchement complet en utilisant une pompe à vide. Il est également possible d'évaporer le méthanol sous un flux d'azote exempt de particules.

- Reconstituer les échantillons avec 1,2 ml de tampon Tris, bien vortexer.

- Equilibrer les extraits pdt 30 min au moins à 2-8°C, puis vortexer encore.

- Conserver les échantillons fermés et congelés à -20°C s'ils ne sont pas immédiatement analysés.

PROCEDURE

REMARQUE: conserver les tubes et les flacons de réactifs sur un lit de glace (0-4°C) durant toute la procédure de pipetage.

1. Identifier 8 tubes coniques en polystyrène en double: de A à E pour les calibrateurs, la liaison non spécifique NSB et les blancs, MB (maximal binding) et T (total activity). Préparer et identifier 2 tubes pour chaque contrôle et chaque échantillon à analyser.
2. Pipeter 600 µl de tampon Tris dans les tubes NSB, et 500 µl de tampon Tris dans les tubes MB. Pipeter 500 µl de calibrateurs reconstitués A à E dans les tubes correspondants. Pipeter 500 µl des extraits d'échantillons et de contrôles reconstitués dans les tubes correspondants et préalablement identifiés.
3. Ajouter 100 µl d'antisérum anti-Ang II à tous les tubes, à l'exception des tubes NSB et T, puis vortexer.
4. Incuber durant 16 heures (±4 heures) à 2-8°C.
5. Ajouter 100 µl de traceur ¹²⁵I-Ang II à tous les tubes. Vortexer. Mettre les tubes T de côté jusqu'à l'étape de mesure (étape 11).
6. Incuber tous les tubes pendant 6 heures (± 30 minutes) à 2-8°C.
7. Retourner plusieurs fois le flacon contenant le second anticorps, y ajouter un agitateur magnétique et le placer sur le support magnétique.
Pendant l'agitation, ajouter 100 µl de second anticorps en suspension à tous les tubes, à l'exception des tubes T puis vortexer.
8. Incuber pdt 30 (± 2) minutes à 2-8°C.
9. Ajouter 1 ml d'eau distillée ou déionisée, à tous les tubes, à l'exception des tubes T.
10. Centrifuger pdt 5 min à 1000 x g et à 2-8°C (*dans le but d'obtenir un sédiment compact, il convient de centrifuger à 2000-3000 x g durant 15 minutes*). Aspirer le surnageant dans chaque tube, à l'exception des tubes T et garder les tubes contenant les sédiments pour le comptage.
11. Procéder à la mesure des tubes pdt 1 minutes dans un compteur-gamma.

RESULTATS & STANDARDISATION

Enregistrer les cpm de tous les tubes (T, NSB, MB, calibrateurs de A à E, échantillons et contrôles) et calculer la moyenne de cpm pour tous les doubles. Soustraire la moyenne des tubes NSB des moyennes des doubles obtenues.

$$\text{Net cpm} = \text{cpm}_{\text{moyenne}} - \text{cpm}_{\text{moyenne NSB}}$$

Calculer la liaison de chaque paire de tubes selon la formule suivante: MB – NSB = 100%.

$$\text{percentbound} = \frac{\text{netcpm}}{\text{netMBcpm}} \times 100$$

Préparer du papier lin/log et reporter les % de liaison sur l'axe vertical et les concentrations d'angiotensine II en pg/ml sur l'axe horizontal pour chaque calibrateur, échantillon et contrôle. Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer au moyen d'un algorithme à 4 paramètres.

Déterminer les concentrations d'angiotensine II pour chaque patient et chaque contrôle à partir de la courbe d'étalonnage. D'autres méthodes de traitement des données peuvent également être employées.

Cf. Table 11 et Figure 1 pour des exemples de courbes d'étalonnage. Ces éléments ne sont donnés qu'à titre d'exemple. Il convient de générer une courbe d'étalonnage lors de chaque dosage.

Les calibrateurs sont étalonnés par rapport à la préparation de référence WHO MRC70/302.

CONTROLE DE QUALITE

Une compréhension approfondie de ce manuel est nécessaire à l'utilisation correcte de ce produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure.

Il n'existe pas de contrôles externes pour l'angiotensine II. En conséquence, il convient pour chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs de référence en plus de l'utilisation d'un contrôle interne.

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage ainsi que des valeurs des contrôles devrait être comprise dans le domaine des valeurs attendues établies par chaque laboratoire. Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de mesure de température et de temps, ii) date de péremption des réactifs, iii) conditions de stockage et d'incubation, iv) pureté de l'eau.

LIMITATIONS

- Les échantillons qui ne sont pas prélevés conformément aux indications de cette brochure risquent de présenter des valeurs d'angiotensine II erronées. Le prélèvement veineux sur tubes EDTA est essentiel pour inhiber l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et la formation consécutive d'angiotensine II à partir de l'angiotensine I. L'utilisation d'un inhibiteur d'angiotensinase, comme la Bestatine (code: B-A22-BST), est fortement recommandée afin d'éviter la transformation d'angiotensine II en angiotensine III.
- La congélation immédiate des échantillons de plasma ou des extraits permettra de conserver l'intégralité des concentrations initiales d'angiotensine II.
- L'interprétation des résultats devra tenir compte des différences éventuelles entre les peptides immunoréactifs et l'angiotensine II biologiquement active (2,11).
- Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte des informations résultant de l'examen clinique du patient et d'autres procédures diagnostiques.
- Certains échantillons de plasma risquent d'obstruer la colonne d'extraction. En conséquence, nous recommandons de centrifuger les échantillons de plasma décongelés durant 1 minute à 10,000 x g et à 2-8°C ou, alternativement durant 5 minutes à 1000 x g, puis de transférer les échantillons aux colonnes d'extraction.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Les caractéristiques de performances de l'essai ont été validées sur des échantillons testés en deux replicata.

Précision intra-essai (Within-Run): 8.3%. Elle a été calculée à partir des résultats de 20 paires de valeurs de 4 échantillons de plasma après extraction puis analyse au cours d'un même essai. Les résultats se trouvent en Table 12.

Précision inter-essai (Run-to-Run): 11.5%. Trois échantillons de plasma furent extraits lors de chaque essai. La précision inter-essai des échantillons fut déterminée à partir des résultats de 20 paires de valeurs au cours de 20 essais consécutifs. Les résultats sont présentés en Table 13.

Limite de détection (LoB): 1.0 pg/ml. 20 doubles du calibrateur zéro (tampon Tris) furent mesurés au cours d'un essai unique. La plus petite concentration d'angiotensine II mesurable fut déterminée en retranchant 2 déviations standard (SD) à la moyenne des cpm de la liaison maximale et en reportant la valeur obtenue sur la courbe d'étalonnage générée au cours du même essai.

Linéarité de la dilution/parallélisme: 93.5%. 2 échantillons de plasma humains présentant des concentrations élevées d'angiotensine II furent dilués avec un pool de plasma exempt d'angiotensine avant extraction puis analysés d'après le protocole standard. Les résultats sont présentés en Table 14.

Test de récupération: 99.2%. Lors de la première série d'analyses, différentes concentrations d'angiotensine II furent ajoutées à 6 échantillons de plasma (4-9) avant extraction puis analysés d'après le protocole standard. Lors de la seconde série d'analyses, 2.5 to 100 pg/ml d'angiotensine II furent ajoutés à 2 échantillons de plasma (A et B) avant extraction puis analysés d'après le protocole standard. Les résultats se trouvent en Table 15.

Spécificité: Les réactions croisées de l'antisérum Ang II présentés Figure 2 furent déterminés à 50 % de liaison.

Comparaison de méthodes: 46 échantillons de patients furent analysés parallèlement en utilisant la trousse Angiotensine II RIA BÜHLMANN et une trousse commerciale utilisée pour la détermination de l'activité de la rénine (PRA). Une régression linéaire des résultats obtenus est présentée en Figure 3. Les intervalles de valeurs obtenues furent respectivement de 0.3 - 81.8 pg/ml pour l'angiotensine II et de 0.1-16.3 ng/ml/heure pour la PRA (12).

DOMAINES DE REFERENCE

Les intervalles de référence suivantes ont été établies au cours de 2 études utilisant des échantillons de plasma (EDTA) de 123 donneurs, à priori sains (5,12).

Ces intervalles de référence sont indicatives. Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs normales, correspondant à sa population de patients.

USO

Il dosaggio BÜHLMANN Angiotensina II è un radioimmunosaggio a doppio anticorpo per la determinazione quantitativa diagnostica *in vitro* dell'Angiotensina II immunoreattiva nel plasma EDTA estratto.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il dosaggio BÜHLMANN Angiotensina II misura l'Angiotensina II immunoreattiva (Ang II) attraverso un radioimmunosaggio a doppio anticorpo utilizzando una modifica del metodo descritta da Emanuel *et al.* (1). I campioni di plasma EDTA estratti, i calibratori ed i controlli sono inizialmente preincubati per 16 ore con un anticorpo anti-Ang II. L'Ang II marcato con I^{125} viene aggiunto e compete con l'Ang II presente nei campioni, nei calibratori e nei controlli per gli stessi siti anticorpali leganti in una seconda incubazione da 6 ore. Dopo questa incubazione, un secondo anticorpo in fase solida viene aggiunto alla miscela. La frazione legata all'anticorpo viene precipitata e contata in un gamma-counter.

Si consiglia di trattare i campioni di plasma con bestatina o un equivalente inibitore dell'angiotensinasi durante il prelievo di sangue per evitare il degrado dell'Ang II (5-8; vedi anche Prelievo dei Campioni e Conservazione).

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

| Reagenti | Quantità | Codice | Ricostituzione |
|--|---------------------|--------------|---|
| Colonne per Estrazione (1 ml) fenilsililicilice ad estrazione in fase inversa | 10 pezzi | B-AEC | |
| Tampone Tris | 1 flacone 100 ml | B-A22-TB | Pronto all'uso |
| Antisiero Anticorpo di coniglio anti-Ang II | 1 flacone 10 ml | B-A22-AS | Pronto all'uso |
| Tracciante Ang II marcato con I^{125} | 1 flacone 11 ml | B-A22-TR | Pronto all'uso |
| Calibratori¹⁾ Ang II liofilo e sintetico | 5 flaconi | B-A22-CASET | Ricostituire ciascun flacone con 5 ml di Tampone Tris |
| Controlli normale/levato²⁾ Ang II liofilo in una matrice/ tampone | 2 flaconi | B-A22-CONSET | Ricostituire ciascun flacone con 5 ml di Tampone Tris |
| Secondo Anticorpo Secondo anticorpo anti-coniglio legato alla fase solida | 1 flacone 11 ml | B-A22-AB2 | Pronto all'uso |

Table 7

¹⁾ Dopo ricostituzione, le soluzioni del calibratore contengono rispettivamente 2, 5, 20, 100 e 500 pg/ml di Ang II.

²⁾ Vedi foglio dei dati di QC per il quantitativo lotto specifico di Ang II

CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

| Reagenti non Aperti | |
|---|--|
| Le colonne devono essere conservate a 18-28°C. Tutti gli altri componenti del kit sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sulle etichette. | |
| Reagenti Aperti / Ricostituiti | |
| Colonne di Estrazione | Le colonne utilizzate devono essere conservate a 18-28°C e protette dalla polvere e dalla luce. |
| Tampone Tris | Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. |
| Antisiero | |
| Tracciante | |
| Calibratori | Stabile per almeno 2 mesi dopo la ricostituzione a -20°C. |
| Controlli | Conservare refrigerato (Non congelare!) Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. |
| Secondo Anticorpo | |

Table 8

PRECAUZIONI**PRECAUZIONI DI SICUREZZA**

- Materiale Radioattivo: Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera i 56 kBq di Iodio¹²⁵.
- Il ricevimento, acquisizione, possesso, utilizzo e trasferimento sono soggetti alle regolamentazioni locali. In

merito alle precauzioni per la manipolazione e l'eliminazione dei reagenti, del materiale radioattivo e dei campioni, consigliamo vivamente di consultare le regolamentazioni specifiche del vostro paese.

PRECAUZIONI TECNICHE

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, modificati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- Possono verificarsi risultati errati per le curve standard, i controlli ed i campioni se la sospensione del secondo anticorpo non è stata correttamente mescolata prima della dispensazione. **Non congelare il secondo anticorpo.**
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Ricostituire i reagenti liofilizzati secondo le indicazioni. Miscelare bene (agitare in modo vorticoso) i reagenti prima dell'uso.
- Il tempo per la conta deve essere sufficiente ad evitare errori statistici e.g. l'accumulo di 2000 cpm produrrà un errore del 5%, 10000 cpm produrranno un errore dell'1%.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso per 100 µl, 500 µl, 1000 µl, e 5000 µl 1000 µl.
- Multipipetta regolabile.
- Provette monouso di polipropilene da (13 x 100 mm) per la preparazione degli estratti di plasma.
- Provette di polistirene coniche per il dosaggio (e.g. Sarstedt 57.477).
- Manicotto per estrazione a vuoto per l'applicazione delle colonne di estrazione (opzionale).
- Metanolo (grado HPLC).
- Acqua distillata o deionizzata.
- Soluzione di Bestatina¹⁾ per il prelievo del campione (opzionale).
- Bagnetto di ghiaccio.
- Centrifuga refrigerata.
- Vortex mixer.
- Barra per agitazione ed agitatore magnetico.
- Dispositivo per aspirazione.
- Evaporatore.
- Gamma-counter.

¹⁾ Il reagente Bestatina può essere ordinato separatamente (codice: B-A22-BST).

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

La procedura richiede 1.2 ml di plasma EDTA per determinazioni in duplicato. E' essenziale seguire una procedura di prelievo appropriata per ottenere risultati accurati dall'analisi Ang II. Campioni emolizzati, molto itterici o lipemici possono intaccare in maniera negativa i risultati.

Procedura Consigliata per il Prelievo: E' importante evitare la generazione dell'Ang I e dell'Ang II *in vitro* a partire dall'angiotensinogeno e dell'Ang I rispettivamente attraverso la Renina e l'ACE, cosiccome la degradazione *in vitro* dell'Ang II in Ang III attraverso le angiotensinasi. La generazione e la degradazione *in vitro* dell'Ang II può essere minimizzata seguendo le procedure di prelievo consigliate.

Prelievo: Prelevare 5 ml di sangue da un paziente in posizione **sdraiata** in una provetta EDTA pre-raffreddata o in una siringa di plastica. Aggiungere immediatamente 100 µl di una soluzione di Bestatina pronta all'uso (vedi sopra) o

inibitore equivalente dell'angiotensinasi (cf. 5,7-9) per 5 ml di un campione di sangue EDTA. Collocare il campione immediatamente in un bagnetto di ghiaccio e procedere con la separazione del plasma entro **1 ora**.

Separazione: Centrifugare il campione per 15 minuti a 1000 x g e a 2-8°C, separare il plasma dalle cellule, aliquotare e congelare il campione immediatamente in provette di polipropilene a -20°C o a temperature inferiori o estrarre prontamente i campioni di plasma.

Procedura di Prelievo Alternativa: Prelevare 5 ml di sangue da un paziente in posizione **sdraiata** in una provetta EDTA pre-raffreddata o in una siringa di plastica e collocare immediatamente il campione nel ghiaccio.

Centrifugare a 1000 x g e a 2-8°C **immediatamente** dopo il prelievo. Separare il plasma dalle cellule, aliquotare e congelare il campione a -20°C in una provetta di polipropilene o estrarre immediatamente i campioni di plasma.

ESTRAZIONE CON COLONNA DEI CAMPIONI DI PLASMA

L'utilizzo del metodo estrattivo in fase inversa è essenziale per ottenere risultati Ang II accurati. I recuperi migliori sono ottenuti con le colonne per estrazione di fenilsililicilice (cf. 2-5). Le colonne per estrazione fornite con questo kit possono **essere utilizzate ciascuna fino a cinque volte** secondo le procedure di estrazione descritte in questo protocollo. Le colonne utilizzate devono essere conservate a 18-28°C e protette dalla luce e dalla polvere. Per evitare l'ostruzione delle colonne, **filtrare o centrifugare i campioni che contengono particelle** quali coaguli di fibrina prima dell'estrazione. Questo metodo di estrazione produce recuperi superiori al 90%. (cf. 5,10,12). La seguente procedura di estrazione è stata **testata e validata per campioni di plasma umano EDTA**. Se vengono utilizzati altri campioni, si consiglia di validare il recupero dell'estrazione utilizzando campioni diluiti con Angiotensina II marcata con I¹²⁵ (e.g. 1 ml di campione diluito con 50 µl di Angiotensina II marcato con I¹²⁵).

Procedura di Estrazione utilizzando un Manicotto a Vuoto

Con l'aiuto della pressione negativa, i fluidi verranno convogliati attraverso la colonna. La procedura è la stessa descritta nella procedura di estrazione utilizzando una centrifuga (cf. sotto).

Devono essere utilizzati i seguenti flussi:

L'applicazione e l'eluizione dei campioni deve essere effettuata con un flusso di 2 ml/min.

Tutti gli altri fluidi possono essere convogliati con un flusso di 5 ml/min.

Procedura di Estrazione utilizzando la Centrifugazione

PREPARAZIONE DELLA COLONNA E CONDITIONING

- Contrassegnare una colonna di estrazione per ciascun campione da estrarre e collocarla in provette di polipropilene per la centrifugazione.

- Aggiungere 2x 1 ml di metanolo alle colonne e centrifugare per 1 minuto a 200 x g.

Nota: Svuotare le provette per evitare che i puntali delle colonne di estrazione vengano a contatto con gli eluati.

- Aggiungere 2x 1 ml di acqua distillata o deionizzata alle colonne, centrifugare per 1 minuto a 200 x g.

- Procedere immediatamente alla dispensazione del campione.

DISPENSAMENTO DEL CAMPIONE

- Caricare 2x 0.6 ml di plasma EDTA nella colonna contrassegnata in maniera corrispondente e centrifugare per 1 minuto a 200 x g.

Nota: Se il campione di plasma EDTA è molto viscoso, ripetere la centrifugazione per 1 minuto a 1000 x g.

LAVAGGIO

- Aggiungere 1 ml di acqua distillata o deionizzata alle colonne, centrifugare per 1 minuto a 500 x g.

Nota: Se la colonna è ostruita, ripetere la centrifugazione per 1 minuto a 1000 x g.

ELUIZIONE DELL'ESTRATTO

- Collocare ciascuna colonna di estrazione in una provetta di polipropilene pulita contrassegnata in maniera corrispondente.

- Aggiungere 1 ml di metanolo alle colonne e centrifugare per 1 minuto a 200 x g.

- **raccogliere l'eluato e conservarlo per il passaggio di evaporazione.**

- Lavare la colonna con 2x 1 ml di metanolo. Eliminare la soluzione di lavaggio eluita.

- Utilizzare la colonna per estrarre il campione successivo (fino a 5 volte) o conservare la colonna a 18-28°C e proteggerla dalla luce e dalla polvere.

EVAPORAZIONE E RICOSTITUZIONE DELL'ESTRATTO

- Evaporare completamente il metanolo utilizzando un concentratore a vuoto dotato di una trappola a freddo. In alternativa, evaporare completamente il metanolo con un getto di particelle prive di nitrogeno.

- Ricostituire i campioni con 1.2 ml di tampone Tris e vortexare completamente.

- Equilibrare gli estratti per almeno 30 minuti a 2-8°C e vortexare ancora.

- Conservare gli estratti ricostituiti chiusi e congelati a -20°C se non dosati immediatamente.

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

Nota: Conservare le provette ed i flaconi dei reagenti in un bagnetto gelato (0-4°C) durante la fase di dispensazione.

1. Etichettare 8 provette in duplicato: dalla A alla E per i calibratori, NSB per il Bianco, MB per il legame massimo e T per le provette dell'attività totale. Etichettare altre provette in duplicato per i campioni ed i controlli.

2. Dispensare 600 µl di Tampone Tris nelle provette NSB, e 500 µl di Tampone Tris nelle provette MB.

Dispensare 500 µl dei calibratori ricostituiti dalla A alla E nelle provette corrispondenti.

Dispensare 500 µl dei campioni dei pazienti estratti e dei controlli ricostituiti in ciascuna delle provette contrassegnate in maniera corrispondente.

3. Aggiungere 100 µl di Antisiero Ang II a tutte le provette eccetto le provette NSB e T. Vortexare.

4. Incubare tutte le provette per 16 ore (+ 4 ore) a 2-8°C.

5. Aggiungere 100 µl di tracciante Ang II marcato con I¹²⁵ a tutte le provette. Vortexare. Rimuovere le provette T, non sarà necessaria un'ulteriore processazione fino alla conta al punto 11.

6. Incubare per 6 ore (± 30 minuti) a 2-8°C.

7. Capovolgere il flacone contenente il secondo anticorpo in fase solida diverse volte, aggiungere una barra agitatrice e collocare il flacone su un agitatore magnetico. Mentre si agita continuamente la sospensione del secondo anticorpo, aggiungere 100 µl della sospensione a tutte le provette (eccetto le provette T). Vortexare.

8. Incubare per 30 minuti (± 5 minuti) a 2-8°C.

9. Aggiungere 1 ml di acqua distillata o deionizzata a tutte le provette (eccetto le provette T).

10. Centrifugare per 5 minuti a 1000 x g e a 2-8°C.

(Per ottenere un pellet compatto, si consiglia una centrifugazione a 2000-3000 x g per 15 minuti).

Aspirare i supernatanti (eccetto le provette T) e conservare i precipitati per la conta.

11. Contare le provette per 1 minuto in un gamma-counter.

RISULTATI E STANDARDIZZAZIONE

Annotare i cpm per tutte le provette (T, NSB, MB, i Calibratori dalla A-E, i campioni ed i Controlli) e calcolare i cpm medi per ciascuna coppia di provette. Sottrarre il bianco medio (provette NSB) dalla media rispettiva per ciascuna coppia di provette:

$$\text{Cpm netti} = \text{cpm}_{\text{Average}} - \text{cpm}_{\text{Average NSB}}$$

Calcolare il legame di ciascuna coppia di provette come percentuale del legame massimo (provette MB), con i cpm corretti con NSB delle provette MB prese al 100%.

$$B/B_0(\%) = \text{percento legato} = \frac{\text{cpm netto}}{\text{MB cpm netto}} \times 100$$

Preparare un grafico lin/log e tracciare la percentuale di legato sull'asse verticale verso la concentrazione di Ang II (pg/ml) sull'asse orizzontale per ciascuno dei Calibratori. Tracciare la curva migliore o calcolare la curva standard utilizzando un algoritmo a quattro parametri. Determinare le concentrazioni Ang II per i campioni ed i Controlli da questa curva standard. Sono ugualmente accettabili metodi alternativi per il calcolo dei dati.

Vedi Table 11 e Figure 1 Per esempi di risultati e di curva standard. *Questi risultati e la curva standard sono solo a scopo dimostrativo. Occorre generare una curva standard per ciascun set di campioni da dosare.*

I Calibratori sono calibrati verso la preparazione di riferimento del OMS MRC70/302.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Occorre attenersi scrupolosamente a quanto descritto in questa metodica per poter utilizzare al meglio il prodotto. Risultati affidabili potranno essere ottenuti solo utilizzando tecniche di laboratorio precise (attuali linee guida GLP) e seguendo accuratamente le istruzioni per l'utilizzo.

L'Ang II non è ad oggi incluso in nessun profilo esterno di QC. Quindi, ciascun laboratorio dovrebbe stabilire i propri valori di riferimento oltre all'utilizzo di un controllo interno.

La riproducibilità dei parametri della curva standard ed i valori dei controlli devono essere entro limiti di accettabilità stabiliti dal laboratorio. I limiti di confidenza per i Controlli sono lotto specifici e stampati sul Foglio di QC aggiunto al kit.

Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude gli errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, dispositivi per il controllo della temperatura e del tempo ii) date di scadenza dei reagenti iii) conservazione e condizioni di incubazione iv) purezza dell'acqua.

LIMITI DELLE PRESTAZIONI

- I campioni non manipolati in maniera appropriata, possono produrre risultati inaccurati di Angiotensina II. Le provette EDTA sono essenziali per inibire l'attività dell'ACE e la conseguente formazione dell'Ang II dall'Ang I. Si consiglia l'utilizzo di un inibitore dell'angiotensinasi, quale la Bestatina (codice: B-A22-BST), per inibire la trasformazione dell'Ang II in Ang III.
- Congelare o estrarre immediatamente i campioni di plasma per garantire l'integrità della concentrazione di Ang II al momento del prelievo.
- L'interpretazione dei risultati deve essere esaminata tenendo in considerazione possibili differenze nei peptidi immunoreattivi e nell'Ang II biologicamente attiva (2,11).
- I risultati del test vanno interpretati insieme alle informazioni derivanti dagli studi epidemiologici, dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.
- Alcuni campioni di plasma possono ostruire le colonne di estrazione. Quindi, per schiarire i campioni di plasma da sostanze che possono interferire con l'andamento del flusso delle colonne di estrazione, si consiglia di centrifugare i

campioni congelati per 1 minuto a 10,000 x g e a 2-8°C o, il alternativa, per 5 minuti a 1000 x g, quindi procedere alla dispensazione dei campioni nelle colonne.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Le caratteristiche di prestazione del dosaggio sono state convalidate in duplicato.

Precisione Intra-Dosaggio (All'interno della stessa seduta): 8.3%. È stata calcolata la precisione intra-dosaggio dai risultati di 20 coppie di valori dai quattro campioni di plasma estratti in un'unica seduta, di 20 coppie di valori da quattro campioni di plasma estratto in un'unica seduta. I valori sono presentati in Table 12.

Precisione Inter-Dosaggio (Da Seduta a seduta): 11.5%. Tre campioni di plasma sono stati estratti ad ogni nuovo dosaggio. La precisione inter-dosaggio dei campioni è stata determinata dai risultati di 20 coppie di valori in 20 sedute consecutive. I valori sono presentati in Table 13.

Limite del Bianco (LoB): 1.0 pg/ml. Sono stati dosati venti duplicati del Calibratore Zero (Tampone Tris) in un'unica seduta. La dose minima rilevabile di Ang II è stata calcolata sottraendo due deviazioni standard (SD) dai cpm medi del legame massimo ed intersecando questo valore con la curva standard ottenuta dalla stessa seduta.

Linearità di Diluizione /Parallelismo: 93.5%. Due campioni di plasma umano contenenti concentrazioni elevate di Ang II sono stati diluiti con un pool di plasma umano privo di Ang II, estratto e successivamente analizzato secondo la procedura del dosaggio. I valori sono presentati in Table 14.

Recupero: 99.2%. Nel primo set di esperimenti, sei campioni di plasma (4-9) sono stati diluiti con diversi quantitativi di Ang II, quindi estratti ed analizzati secondo il dosaggio. Nel secondo set di esperimenti, sono stati estratti due campioni di plasma (A e B), diluiti con 2.5 fino a 100 pg/ml di Ang II e quindi dosati secondo il dosaggio. I risultati sono presentati in Table 15.

Specificità: Le crossreazioni dell'antisiero Ang II sono presentate in Figure 1 e sono state determinate al 50% del legame.

Comparazione di Metodo: Sono stati dosati 46 campioni utilizzando il dosaggio Angiotensina II RIA della BÜHLMANN ed un kit disponibile in commercio per determinare l'attività della renina nel plasma. (PRA). Un'analisi della regressione lineare dei risultati viene presentati in **Figure 3**. Il range di valori andava rispettivamente da 0.3 a 81.8 pg/ml per l'Ang II e da 0.1 a 16.3 ng/ml/ora per il PRA (12).

INTERVALLO DI RIFERENZA

In due studi che hanno utilizzato campioni di plasma EDTA provenienti da 123 donatori in apparente buono stato di salute, sono stati stabiliti i seguenti rangi attesi (5,12):

Questi rangi attesi devono essere utilizzati solo come linee guida. Si consiglia ad ogni laboratorio di stabilire il proprio intervallo di riferimento per la propria popolazione di pazienti.

USO PREVISTO

Angiotensin II de BÜHLMANN es un radioinmunoanálisis de doble anticuerpo diseñado para la determinación diagnóstica cuantitativa *in vitro* de angiotensina II inmunorreactiva en plasma extraído con EDTA.

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

El radioinmunoanálisis Angiotensin II de BÜHLMANN mide la angiotensina II (Ang II) inmunorreactiva mediante un radioinmunoanálisis de doble anticuerpo utilizando una modificación del método descrito por Emanuel y cols. (1). Primero se preincuban las muestras de plasma extraído con EDTA, los calibradores y los controles durante 16 horas con un anticuerpo anti-Ang II. Se añade ¹²⁵I-Ang II, que compite con la Ang II presente en las muestras, los calibradores y los controles por los mismos sitios de unión del anticuerpo en un segundo paso de incubación de 6 horas. Después de esta incubación se añade un segundo anticuerpo de fase sólida a la mezcla. La fracción unida al anticuerpo se precipita y se cuenta en un contador gamma.

Se recomienda tratar las muestras de plasma con bestatina o con un inhibidor de las angiotensinasas equivalente mientras se toman las muestras de sangre para evitar la degradación de la Ang II (5-8; véase también Recogida y almacenamiento de muestras).

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

| Reactivos | Cantidad | Código | Reconstitución |
|---|------------------|--------------|--|
| Columnas de extracción (1 ml) extracción de fase inversa de fenilsililicio | 10 unidades | B-AEC | |
| Tampón Tris | 1 vial 100 ml | B-A22-TB | Listo para usar |
| Antisuero anticuerpo anti-Ang II de conejo | 1 vial 10 ml | B-A22-AS | Listo para usar |
| Trazador ¹²⁵ I-Ang II | 1 vial 11 ml | B-A22-TR | Listo para usar |
| Calibradores ¹⁾ Ang II sintética liofilizada | 5 viales | B-A22-CASET | Reconstituir cada vial con 5 ml de tampón Tris |
| Controles normal/alto ²⁾ Ang II liofilizada en una matriz de tampón | 2 viales | B-A22-CONSET | Reconstituir cada vial con 5 ml de tampón Tris |
| Segundo anticuerpo segundo anticuerpo anti-conejo unido a fase sólida | 1 vial 11 ml | B-A22-AB2 | Listo para usar |

Tabla 9

¹⁾ Después de la reconstitución, las soluciones de los calibradores contendrán 2, 5, 20, 100 y 500 pg/ml de Ang II.

²⁾ Consulte la hoja de datos de control de calidad para la cantidad de Ang II específica del lote

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

| Reactivos sin abrir | |
|--|---|
| Las columnas deben almacenarse a 18-28°C. Todos los componentes del kit son estables a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas. | |
| Reactivos abiertos / reconstituidos | |
| Columnas de extracción | Las columnas utilizadas deben almacenarse a 18-28°C protegidas del polvo y de la luz. |
| Tampón Tris | Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. |
| Antisuero | |
| Trazador | |
| Calibradores | Estable como mínimo 2 meses después de la reconstitución a -20°C. |
| Controles | |
| Segundo anticuerpo | Almacénese refrigerado (¡No lo congele!) Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. |

Tabla 10

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- Material radiactivo: Este kit contiene material radiactivo que no supera 56 kBq de yodo 125.
- La recepción, adquisición, posesión, el uso y la cesión están sujetos a las normativas locales. Respecto a las precauciones adecuadas para la manipulación y eliminación de los reactivos del kit, material radiactivo, desechos radiactivos y especímenes de los pacientes, recomendamos encarecidamente que consulte primero las normativas locales especiales de su país.

PRECAUCIONES TÉCNICAS

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- Se pueden producir resultados irregulares en las curvas estándar, los controles y las muestras si no se ha mezclado adecuadamente la suspensión del segundo anticuerpo antes de pipetear. **No congele el segundo anticuerpo.**
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.
- Deje atemperar los reactivos hasta que alcancen la temperatura ambiente. Reconstituir los reactivos liofilizados según las instrucciones. Mezcle bien (con agitador de vórtice) los reactivos antes de su uso.
- Si la lectura de la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que la del calibrador más alto, la muestra extraída debe diluirse con el tampón Tris y ensayarse de nuevo según el procedimiento del ensayo.
- El tiempo de recuento debe ser suficiente para evitar un error estadístico del recuento: p.ej., la acumulación de 2000 cpm producirá un error del recuento del 5%, 10000 cpm producirán un error de recuento del 1%.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión de 100 µl, 500 µl, 1000 µl y 5000 µl con puntas desechables.
- Tubos de polipropileno desechables (13 x 100 mm) para la preparación de extractos de plasma.
- Tubos cónicos de poliestireno para el ensayo (p.ej. Sarstedt 57.477).
- Colector de vacío de extracción para aplicación a las columnas de extracción (opcional).
- Metanol (se recomienda el grado HPLC)
- Agua destilada o desionizada.
- Solución de bestatina¹⁾ para la recogida de muestras (opcional).
- Baño de hielo
- Centrífuga refrigerada.
- Mezclador vórtex.
- Barra de agitación y agitador magnético.
- Dispositivo de aspiración.
- Evaporador.
- Contador gamma.

¹⁾ El reactivo de bestatina se puede pedir por separado (referencia: B-A22-BST).

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Este procedimiento requiere 1,2 ml de plasma con EDTA para las determinaciones por duplicado. La recogida adecuada de las muestras es esencial para asegurar la exactitud de los resultados del análisis de Ang II. Las muestras hemolizadas, altamente ictéricas o lipémicas pueden afectar de manera adversa a los resultados.

Procedimiento recomendado de recogida: Es importante evitar la generación *in vitro* de Ang I y Ang II a partir de la angiotensinogena y de la Ang I por la renina y la ECA, respectivamente, así como la degradación *in vitro* de Ang II a Ang III por las angiotensinasas. La generación y la degradación *in vitro* de la Ang II se puede minimizar si se sigue este procedimiento de recogida recomendado:

Recogida: Recoja 5 ml de sangre de un paciente **recostado** en una jeringa de plástico o en un tubo de venipunción con EDTA enfriado previamente. Añada inmediatamente 100 µl de solución de bestatina lista para usar (véase arriba) o de un inhibidor de las angiotensinasas equivalente (*cf.* 5,7-9) por 5 ml de muestra de sangre con EDTA. Coloque inmediatamente la muestra en un baño de hielo y proceda con la separación de plasma antes de que transcurra **1 hora**.

Separación: Centrifugue la muestra durante 15 minutos a 1000 x g y 2-8°C, separe el plasma de las células, haga partes alícuotas y congele el espécimen inmediatamente en tubos de polipropileno a -20°C o menos o extraiga las muestras de plasma sin demora.

Procedimiento alternativo de recogida: Recoja 5 ml de sangre de un paciente **recostado** en un tubo de venipunción con EDTA refrigerado previamente o en una jeringa de plástico y coloque inmediatamente la muestra en hielo. Centrifugue a 1000 x g y 2-8°C **inmediatamente** después de la recogida. Separe el plasma de las células, haga alícuotas y congele el espécimen en tubos de polipropileno a -20°C o menos o extraiga las muestras de plasma sin demora.

EXTRACCIÓN CON COLUMNAS DE LAS MUESTRAS DE PLASMA

El uso de un método de extracción de fase inversa es fundamental para obtener unos resultados exactos de Ang II. Las mejores recuperaciones se obtienen con columnas de extracción de fenilsililicio (*cf.* 2-5). Las columnas de extracción suministradas con este kit pueden **utilizarse hasta cinco veces cada una** si se usan de acuerdo con los procedimientos de extracción descritos en este protocolo. Las columnas usadas deben almacenarse a 18-28°C protegidas de la luz y del polvo. Para evitar el atasco de las columnas, **filtre o centrifugue las muestras que contengan partículas**, como coágulos de fibrina, antes de la extracción. Este método de extracción normalmente produce recuperaciones superiores al 90 % (*cf.* 5,10,12). El siguiente procedimiento de extracción se **probó y se validó para muestras de plasma humano con EDTA**. Si se utilizan otros especímenes, se recomienda que se valide la recuperación de la extracción utilizando un espécimen enriquecido con ¹²⁵I-angiotensina II (por ejemplo, 1 ml de espécimen enriquecido con 50 µl de ¹²⁵I-angiotensina II).

Procedimiento de extracción utilizando colector de vacío
Pase los líquidos a través de la columna con la ayuda de presión negativa. Este procedimiento es el mismo que el que se describe en el Procedimiento de extracción utilizando centrifugación (ver abajo).

Será necesario utilizar los siguientes flujos:

La aplicación y la elución de la muestra debe realizarse a un flujo de 2 ml/min

Todos los demás líquidos pueden pasar por la columna a un flujo de 5 ml/min.

Procedimiento de extracción utilizando centrifugación

PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA COLUMNA

- Marque una columna de extracción para cada muestra que se deba extraer y colóquelas en tubos de centrifugación de polipropileno.

- Añada 2x 1 ml de metanol a las columnas y centrifugue durante 1 minuto a 200 x g.

Nota: Vacíe los tubos para evitar que las puntas de las columnas de extracción entren en contacto con los eluatos.

- Añada 2x 1 ml de agua destilada o desionizada a las columnas y centrifugue durante 1 minuto a 200 x g.

- Proceda con la aplicación de las muestras sin demora.

APLICACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Cargue 2x 0.6 ml de muestra de plasma con EDTA en la correspondiente columna marcada y centrifugue durante 1 minuto a 200 x g.

Nota: Si la muestra de plasma con EDTA tiene un alto grado de viscosidad, repita la centrifugación durante 1 minuto a 1000 x g.

LAVADO

- Añada 1 ml de agua destilada o desionizada a las columnas y centrifugue durante 1 minuto a 500 x g.

Nota: Si se atasca la columna, repita la centrifugación durante 1 minuto a 1000 x g.

ELUCIÓN DEL EXTRACTO

- Coloque cada columna de extracción en un tubo limpio de polipropileno marcado de manera correspondiente.

- Añada 1 ml de metanol a las columnas y centrifugue durante 1 minuto a 200 x g.

- **Recoger el eluato y guárdelo para la fase de evaporación.**

- Lave las columnas con 2x 1 ml de metanol. Deseche la solución de lavado eluida.

- Utilice la columna para la extracción de la siguiente muestra (hasta 5 veces) o almacene la columna a 18-28°C y protegida de la luz y del polvo.

EVAPORACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DEL EXTRACTO

- Evapore el metanol hasta la sequedad utilizando un concentrador de vacío con una trampa de frío. También puede evaporar el metanol hasta la sequedad con una corriente de nitrógeno sin partículas.

- Reconstituya las muestras con 1,2 ml de tampón Tris y agite bien con el vórtex.

- Equilibre los extractos como mínimo 30 minutos a 2-8°C y agite con el vórtex de nuevo.

- Almacene los extractos reconstituidos tapados y congelados a -20°C si no se realizan los ensayos inmediatamente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Nota: Guarde los tubos del ensayo y los viales de los reactivos en un baño de hielo (0-4°C) durante todos los pasos del pipeteado.

1. Etiquete 8 tubos por duplicado: A a E para los tubos de los calibradores, NSB para los tubos del blanco, MB para los tubos de máxima unión y T para los tubos de actividad total. Etiquete tubos adicionales por duplicado para las muestras de los pacientes y los controles.
2. Pipetee 600 µl de tampón Tris en los tubos NSB y 500 µl de tampón Tris en los tubos MB.
Pipetee 500 µl de los calibradores reconstituidos A a E en los tubos correspondientes.
Pipetee 500 µl de las muestras extraídas de los pacientes y de los controles reconstituidos en todos los tubos marcados de la forma correspondiente.

3. Añada 100 µl del antisuero Ang II a todos los tubos excepto a los tubos NSB y T. Agite con el vórtex.
4. Incube todos los tubos durante 16 horas (+ 4 horas) a 2-8°C.
5. Añada 100 µl del trazador ¹²⁵I-Ang II a todos los tubos. Agite con el vórtex. Retire los tubos T, puesto que ya no serán necesarios en el resto del proceso hasta el recuento del paso 11.
6. Incube durante 6 horas (± 30 minutos) a 2-8°C.
7. Invierta varias veces la botella que contiene el segundo anticuerpo en fase sólida, añada una barra de agitación y coloque la botella en un agitador magnético. Mientras se agita de manera continuada la suspensión del segundo anticuerpo, añada 100 µl de la suspensión a todos los tubos de ensayo (excepto a los tubos T). Agite con el vórtex.
8. Incube durante 30 minutos (± 5 minutos) a 2-8°C.
9. Añada 1 ml de agua destilada o desionizada a todos los tubos (excepto a los tubos T).
10. Centrifugue durante 5 minutos a 1000 x g y 2-8°C (para obtener un pellet compacto se recomienda una centrifugación a 2000-3000 x g durante 15 minutos). Aspire los sobrenadantes (excepto en los tubos T) y conserve los precipitados para el recuento.
11. Cuente los tubos durante 1 minuto en un contador gamma.

RESULTADOS Y ESTANDARIZACIÓN

Registre las cpm de todos los tubos (T, NSB, MB, calibradores A-E, muestras y controles) y calcule el promedio de cpm de cada par de tubos. Reste el promedio del blanco del ensayo (tubos NSB) del promedio respectivo de cada par de tubos:

$$\text{cpm netas} = \text{cpm}_{\text{Promedio}} - \text{cpm}_{\text{Promedio de NSB}}$$

Calcule la unión de cada par de tubos como un porcentaje de la máxima unión (tubos MB), considerando las cpm de los tubos MB corregidas por el NSB como el 100%.

$$B/B_0(\%) = \text{porcentaje unido} = \frac{\text{cpm netas}}{\text{cpm MB netas}} \times 100$$

Prepare un papel gráfico semilogarítmico y represente el porcentaje unido en el eje vertical frente a la concentración de Ang II (pg/ml) en el eje horizontal para cada uno de los calibradores. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de cuatro parámetros. Determine las concentraciones de Ang II para las muestras de los pacientes y los controles a partir de esta curva estándar. Son aceptables igualmente métodos alternativos de reducción de datos.

Véanse Table 11 y Figure 1 para ejemplos de resultados y curvas estándar. *Estos resultados y curvas estándar se ofrecen únicamente con propósitos de demostración. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras que se ensaye.*

Estandarización: Los calibradores están calibrados contra la preparación de referencia de la OMS MRC70/302.

CONTROL DE CALIDAD

Es necesario comprender totalmente estas instrucciones de uso para que la utilización del producto dé unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente estas instrucciones de uso.

De momento, Ang II no está incluida en ningún plan externo de control de calidad. Por lo tanto, cada laboratorio tendrá que establecer sus propios valores de referencia, además de utilizar un control interno.

La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe encontrarse dentro de los límites establecidos de aceptabilidad del laboratorio. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad adicional del kit.

Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) fechas de caducidad de los reactivos iii) condiciones de almacenamiento e incubación iv) pureza del agua.

LIMITACIONES DE RENDIMIENTO

- Las muestras de pacientes que no se manipulen correctamente pueden producir resultados incorrectos de angiotensina II. Los tubos de venipunción con EDTA son fundamentales para inhibir la actividad de la ECA y la formación subsiguiente de Ang II a partir de Ang I. Se recomienda encarecidamente un inhibidor de las angiotensinasas, como por ejemplo bestatina (ref: B-A22-BST), para inhibir la transformación de Ang II en Ang III.
- La congelación inmediata de las muestras de plasma o su extracción sin demora preservará la integridad de la concentración de Ang II en el momento del muestreo.
- La interpretación de los resultados tendrá que examinarse teniendo en cuenta las posibles diferencias en péptidos inmunorreactivos y Ang II biológicamente activa (2,11).
- Los resultados del ensayo deben interpretarse considerando la información disponible de la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.
- Algunas muestras de plasma pueden atascar las columnas de extracción. Por lo tanto, para limpiar las muestras de plasma de sustancias que puedan interferir en el flujo de la columna de extracción, se recomienda centrifugar las muestras de plasma descongeladas durante 1 minuto a 10.000 x g y 2-8°C, o bien durante 5 minutos a 1000 x g, y después proceder a pipetear las muestras en las columnas.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Las características de rendimiento del análisis han sido validadas por duplicado.

Precisión intra-ensayo (dentro de la prueba): 8,3%. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores de cuatro muestras de plasma extraídas obtenidos en una única prueba. Los valores se presentan en Table 12.

Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 11,5%. Se extrajeron tres muestras de plasma cada vez que se realizó un ensayo. La precisión inter-ensayo de las muestras se determinó después a partir de los resultados de 20 pares de valores en 20 pruebas consecutivas. Los valores se presentan en Table 13.

Límite para el blanco (LoB): 1,0 pg/ml. Se ensayaron veinte duplicados del calibrador cero (tampón Tris) en una única prueba. La dosis mínima detectable de Ang II se calculó restando dos desviaciones estándar (DE) del promedio de las cpm de la máxima unión y calculando la intersección de este valor con la curva estándar obtenida en la misma prueba.

Linealidad/paralelismo de dilución: 93,5%. Se diluyeron dos muestras de plasma humano que contenían altas concentraciones de Ang II con una reserva de plasma humano sin Ang II, se extrajeron y posteriormente se analizaron siguiendo el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan en Table 14.

Recuperación del spiking: 99,2%. En la primera tanda de experimentos se enriquecieron seis muestras de plasma (4-9)

con diferentes cantidades de Ang II, se extrajeron posteriormente y se analizaron siguiendo el procedimiento del ensayo. En la segunda tanda de experimentos se extrajeron dos muestras de plasma (A y B), se enriquecieron con 2,5-100 pg/ml de Ang II y se ensayaron siguiendo el procedimiento del ensayo. Los resultados se presentan en Table 15.

Especificidad: Las reacciones cruzadas del antisuero de Ang II presentadas en Figure 2 se determinaron en la unión al 50 %.

Comparación del método: Se analizaron 46 muestras de pacientes utilizando el radioinmunoanálisis de angiotensina II de BÜHLMANN y un kit disponible comercialmente para determinar la actividad de la renina plasmática (PRA). Se presenta un análisis de regresión lineal de los resultados en **Figure 3**. El intervalo de valores fue 0,3 – 81,8 pg/ml para Ang II y 0,1-16,3 ng/ml/hora para PRA (12).

INTERVALOS DE REFERENCIA

En dos estudios en los que se utilizaron muestras de plasma con EDTA de 123 donantes aparentemente sanos se establecieron los siguientes **valores normales** (5,12):

Estos intervalos normales deben utilizarse únicamente como orientativos. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo esperado para su población de pacientes.

Nota: La interpretación de los resultados tendrá que examinarse teniendo en cuenta las posibles diferencias en péptidos inmunorreactivos y angiotensina II biológicamente activa (2,11).

Table 11: **Example of Results**

| Tubes | cpm | B/T (%) | B/B ₀ (%) | conc. (pg/ml) | CV conc. (%) |
|--------------------------|--------------|-------------|----------------------|---------------|--------------|
| Total | 26870 | 100 | | | |
| Total | 26157 | 100 | | | |
| Total Avg. | 26514 | 100 | | | |
| NSB | 317 | 1.2 | | | |
| NSB | 386 | 1.5 | | | |
| NSB Avg. | 352 | 1.3 | | | |
| MB | 7468 | 28.2 | 100 | 0 | |
| MB | 7358 | 27.8 | 100 | 0 | |
| MB Avg. | 7413 | 28.0 | 100 | 0 | |
| Calibrator A | 7077 | 26.7 | 95.2 | 2 | |
| Calibrator A | 7088 | 26.7 | 95.4 | 2 | |
| Calibrator A Avg. | 7083 | 26.7 | 95.3 | 2 | 1.9 |
| Calibrator B | 6517 | 24.6 | 87.2 | 5 | |
| Calibrator B | 6573 | 24.8 | 88.0 | 5 | |
| Calibrator B Avg. | 6545 | 24.7 | 87.6 | 5 | 5.0 |
| Calibrator C | 5032 | 19.0 | 66.0 | 20 | |
| Calibrator C | 5028 | 19.0 | 66.0 | 20 | |
| Calibrator C Avg. | 5030 | 19.0 | 66.0 | 20 | 0.2 |
| Calibrator D | 3043 | 11.5 | 37.7 | 100 | |
| Calibrator D | 3070 | 11.6 | 38.1 | 100 | |
| Calibrator D Avg. | 3056 | 11.5 | 37.9 | 100 | 1.7 |
| Calibrator E | 1415 | 5.3 | 14.5 | 500 | |
| Calibrator E | 1422 | 5.4 | 14.6 | 500 | |
| Calibrator E Avg. | 1419 | 5.4 | 14.5 | 500 | 0.5 |
| Control Normal | 6630 | 25.0 | 88.8 | 4.5 | |
| Control Normal | 6679 | 25.2 | 89.5 | 4.2 | |
| Control N. Avg. | 6654 | 25.1 | 89.2 | 4.3 | 4.8 |
| Control Elevated | 2642 | 10.0 | 32.0 | 146.3 | |
| Control Elevated | 2662 | 10.0 | 32.2 | 143.6 | |
| Control E. Avg. | 2652 | 10.0 | 32.1 | 144.9 | 1.3 |
| Sample 1 | 6430 | 24.3 | 86.0 | 5.7 | |
| Sample 1 | 6543 | 24.7 | 87.6 | 5.0 | |
| Sample 1 Avg. | 6487 | 24.5 | 86.8 | 5.4 | 9.6 |

ED₂₀ = 335.7 pg/ml ED₅₀ = 48.8 pg/ml ED₈₀ = 8.8 pg/ml

Figure 1: **Example of a Standard Curve**

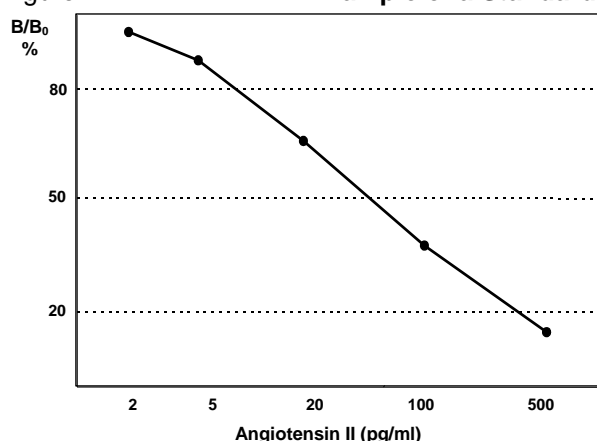


Table 12: **Intra-Assay Precision (Within-Run)**

| Sample | Mean Value [pg/ml] | SD [pg/ml] | CV [%] |
|----------|--------------------|------------|--------|
| Normal 1 | 5.9 | 0.67 | 11.3 |
| Normal 2 | 5.8 | 0.59 | 10.3 |
| Elevated | 97.6 | 4.24 | 4.3 |
| High | 242.2 | 17.1 | 7.1 |
| Mean | | | 8.3 |

Table 13: **Inter-Assay Precision (Run-to-Run)**

| Sample | Mean Value [pg/ml] | SD [pg/ml] | CV [%] |
|--------------|--------------------|------------|--------|
| Normal | 4.1 | 0.74 | 18.1 |
| Elevated 20 | 24.2 | 2.59 | 10.7 |
| Elevated 150 | 152.9 | 8.84 | 5.8 |
| Mean | | | 11.5 |

Table 14: **Dilution Linearity/Parallelism**

| Sample | Dilution | Observed [pg/ml] | Expected [pg/ml] | O/E [%] |
|--------|----------|------------------|------------------|---------|
| C | 1:1 | 200.9 | --- | --- |
| | 1:2 | 102.0 | 100.5 | 102 |
| | 1:4 | 48.9 | 50.2 | 97 |
| | 1:8 | 21.5 | 25.1 | 86 |
| | 1:16 | 12.0 | 12.6 | 96 |
| | 1:32 | 6.4 | 6.3 | 102 |
| | 1:64 | 3.7 | 3.1 | 117 |
| D | 1:1 | 217.0 | --- | --- |
| | 1:2 | 93.7 | 108.5 | 86 |
| | 1:4 | 49.3 | 54.3 | 91 |
| | 1:8 | 23.2 | 27.1 | 86 |
| | 1:16 | 10.8 | 13.6 | 80 |
| | 1:32 | 6.1 | 6.8 | 90 |
| | 1:64 | 3.0 | 3.4 | 89 |
| Mean | | | | 93.5 |

Table 15: **Spiking Recovery**

| Sample | endogen. Ang II (pg/ml) | Ang II added (pg/ml) | expected value (E) (pg/ml) | observed value (O) (pg/ml) | recovery O/E (%) |
|--------|-------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|------------------|
| 4 | 5.8 | 10 | 15.8 | 13.4 | 85 |
| 5 | 6.5 | 20 | 26.5 | 24.7 | 94 |
| 6 | 5.4 | 50 | 55.4 | 56.5 | 102 |
| 7 | 6.4 | 85 | 91.4 | 91.2 | 100 |
| 8 | 6.0 | 100 | 106.0 | 105.3 | 99 |
| 9 | 6.4 | 250 | 256.4 | 256.4 | 100 |
| A | 7.1 | 2.5 | 9.6 | 8.9 | 93 |
| | | 5 | 12.1 | 12.0 | 99 |
| | | 10 | 17.1 | 17.8 | 104 |
| | | 25 | 32.1 | 32.3 | 100 |
| B | 12.2 | 50 | 57.1 | 58.0 | 101 |
| | | 5 | 17.2 | 16.3 | 95 |
| | | 10 | 22.2 | 24.0 | 108 |
| | | 20 | 32.2 | 35.1 | 109 |
| | | 50 | 62.2 | 62.1 | 100 |
| | | 100 | 112.2 | 110.4 | 98 |
| Mean | | | | | 99.2 |

Figure 2: **Cross-Reactivity of Ang II Antiserum**

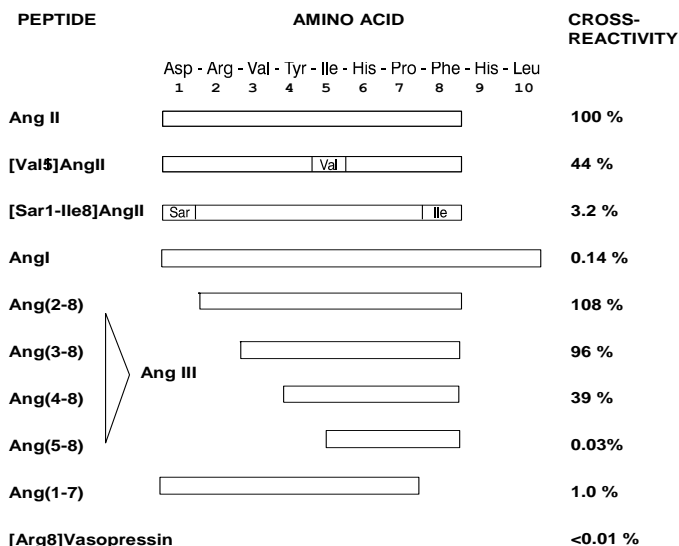


Figure 3: **Method Comparison**

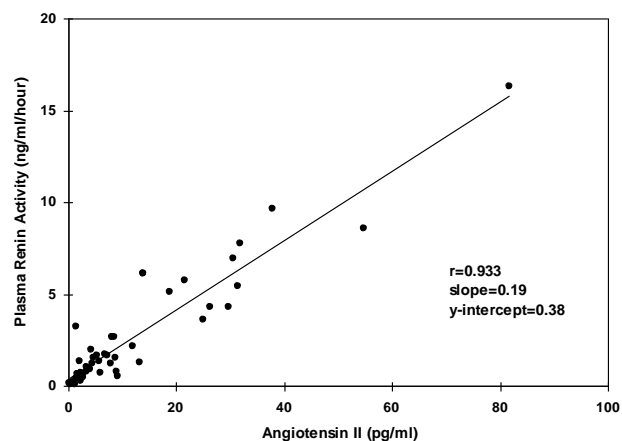


Table 16: **Expected Values**

| | Switzerland (5) | USA (12) |
|-----------------------|-----------------|----------|
| n | 81 | 42 |
| Median Value (pg/ml) | 5.9 | 5.9 |
| S.D. (pg/ml) | 3.41 | 2.82 |
| Lowest Value (pg/ml) | 0.8 | 0.9 |
| Highest Value (pg/ml) | 16.0 | 13.8 |

Table description: cf. "Results" (page 4), "Performance Characteristics" and "Reference Intervals" (page 5).

Tabellenbeschreibung: siehe "Resultate" (Seite 8), "Leistungsmerkmale" und "Referenzintervalle" (Seite 8).

Explications relatives aux tableaux: voir « Résultats » (page 11), "Caractéristiques de Performance" et « Domaines de référence » (page 12).

Descrizione tavola: cf. "Risultati" (pagina 15), "Caratteristiche di Prestazione" et "Intervallo di referenza" (pagina 16)

Explicaciones relativas a las Tablas: ver "Resultados", "Características de Eficiencia" (página 18) y "intervalos de referencia" (página 20).

APPENDIX II






REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ REFERENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

- Emanuel, R.L. *et al.*: Double antibody radioimmunoassay of renin activity and Angiotensin II in human peripheral plasma. *J. Lab. Clin. Med.* **81**, 632-640 (1973).
- Nussberger, J. *et al.*: True versus immunoreactive Angiotensin II in human plasma. *Hypertension* **7** (suppl. 1), 1-7 (1985).
- Mento, P.R. and Wilkes, B.M.: Plasma angiotensins and blood pressure during converting enzyme inhibition. *Hypertension* **6** (suppl. III) 42III-48III (1987).
- Voelker J.R. *et al.*: Improved HPLC-Radioimmunoassay for quantifying Angiotensin II in plasma. *Clin. Chem.* **40**, 1537-1543 (1994).
- Weber, J. and Haldimann, D.: Specific measurement of low Angiotensin II concentrations in plasma. *FASEB J.* **7**, A546 (Abstract 3165) (1993). Poster presented at Exp. Biol. Congress, New Orleans, March 29 - April 1 (1993).
- Unger, T., Gohlke, P.: Tissue renin-angiotensin systems in the heart and vasculature: possible involvement in the cardiovascular actions of converting enzyme inhibitors. *Am. J. Cardiol.* **65**, 31-101 (1990).
- Hidaka H. *et al.*: An improved method for measuring Angiotensin I converting enzyme using a highly sensitive Angiotensin II radioimmunoassay. *Endocrinol. Japon.* **32**, 803-809 (1985).
- Ishida H. *et al.*: Interrelation between the renin-angiotensin system and kallikrein-kinin system in patients with essential hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* **198**, 329-336 (1986).
- Boer, P. *et al.*: Response of urinary angiotensin to challenges of the renin-angiotensin systems. *Clin. Chim. Acta* **199**, 195-204 (1991).
- Nussberger, J. *et al.*: Octapeptide-specific and sensitive assay for Angiotensin II in plasma. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **25**, 257-268 (1986).
- Semple, P.F. *et al.*: Angiotensin II and its heptapeptide (2-8), hexapeptide (3-8) and pentapeptide (4-8) metabolites in arterial and venous blood of man. *Circ. Res.* **39**, 671-678 (1976).
- Sica D. *et al.*: A novel analytical method for the determination of Angiotensin II. *Clin. Chem.* **42**, S231 (Abstract 565) (1996). Poster presented at the 48th Annual Meeting of the Am Assoc Clin Chem, Chicago, July 28 - August 1 (1996).

| PIPETTING PROTOCOL ANGIOTENSIN II | | | | | | | | |
|-----------------------------------|------------------|--------------------------------|----------------|--|-------------|--|----------------------|--|
| Polystyrene Tubes in Duplicate | Tris Buffer (μl) | Standard, Control, Sample (μl) | Antiserum (μl) | | Tracer (μl) | | Second Antibody (μl) | |
| Total | | | | | 100 | | | vortex and incubate at 2-8°C for 30 min (± 5 min) |
| NSB | 600 | | | | 100 | | 100 | |
| MB | 500 | | 100 | | 100 | | 100 | add 1 ml of deionized water and centrifuge for 5 min at 2-8°C and 1000 x g |
| Std 2 pg/ml | | 500 | 100 | | 100 | | 100 | |
| Std 5 pg/ml | | 500 | 100 | | 100 | | 100 | vortex and incubate at 2-8°C for 6 hours (± 30 min) |
| Std 20 pg/ml | | 500 | 100 | | 100 | | 100 | |
| Std 100 pg/ml | | 500 | 100 | | 100 | | 100 | |
| Std 500 pg/ml | | 500 | 100 | | 100 | | 100 | aspirate supernatant (except T tubes) and count for 1 min |
| Normal Control | | 500 | 100 | | 100 | | 100 | |
| Elevated Control | | 500 | 100 | | 100 | | 100 | |
| Sample | | 500 | 100 | | 100 | | 100 | |

Table 17

APPENDIX IV
SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

| Symbol | Explanation |
|---|--|
|  | Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad |
| REF | Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo |
| LOT | Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote |
|  | Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura |
|  | Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso |
|  | Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für „n“ Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos |
|  | Radioactive Material Radioaktives Material Matériel radioactif Materiale radioattivo Material radiactivo |

| Symbol | Explanation |
|----------------------|--|
| AEC | Extraction Columns Extraktionssäulen Colonne d'extraction Colonne d' estrazione Columnas de extracción |
| BUF TRIS | Tris Buffer Tris-Puffer Tampon Tris Tampone Tris Tampón Tris |
| Ab | Antiserum Antiserum Antisérum Antisiero Antisuero |
| TR | Tracer Tracer Traceur Elemento tracciante Trazador |
| CAL A - CAL E | Calibrator A - E Kalibrator A - E Calibreur A - E Calibratore A - E Calibrador A - E |
| CONTROL N | Control Normal Normalkontrolle Contrôle normal Controllo normale Control normal |
| CONTROL H | Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto |
| Ab2 | 2 nd Antibody 2. Antikörper 2 ^{ème} Anticorps Secondo anticorpo Segundo anticuerpo |



Printing Date
2013-01-14