

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



## Users Manual

# Renin ELISA



DE5125



96

**Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido / Contenu**

1	INTRODUCTION .....	3
2	PRINCIPLE OF THE TEST .....	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	4
4	REAGENTS.....	5
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION .....	6
6	ASSAY PROCEDURE.....	7
7	EXPECTED NORMAL VALUES .....	9
8	QUALITY CONTROL.....	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	9
10	LIMITATIONS OF USE.....	11
11	LEGAL ASPECTS .....	11
12	REFERENCES / LITERATURE .....	12
1	EINLEITUNG .....	13
2	TESTPRINZIP .....	14
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	14
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	15
5	PROBENVORBEREITUNG.....	16
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	17
7	ERWARTETE WERTE .....	19
8	QUALITÄTS-KONTROLLE.....	19
9	ASSAY CHARACTERISTIKA .....	19
10	GRENZEN DES TESTS .....	20
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	20
12	REFERENZEN / LITERATUR .....	20
1	INTRODUZIONE .....	21
2	PRINCIPIO DEL TEST .....	21
3	PRECAUZIONI .....	21
4	COMPONENTI DEL KIT.....	22
5	CAMPIONI.....	23
6	ATTUAZIONE DEL TEST .....	24
7	VALORI NORMALI .....	26
8	CONTROLLO QUALITÀ .....	26
9	CARATTERISTICHE DEL TEST .....	26
10	LIMITAZIONE DEL TEST .....	27
11	ASPETTI LEGALI .....	27
12	BIBLIOGRAFIA.....	27
1	INTRODUCCIÓN.....	28
2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO.....	28
3	PRECAUCIONES.....	28
4	COMPONENTES DEL KIT .....	29
5	MUESTRAS.....	30
6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO.....	31
7	VALORES ESPERADOS .....	33
8	CONTROL DE CALIDAD.....	33
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO .....	33
10	LIMITACIONES DE USO.....	34
11	ASPECTOS LEGALES.....	34
12	REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA .....	34
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS.....		35

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

The **DEMEDIATEC Renin ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of active Renin in human serum and plasma.

Renin measurements are used in the diagnosis and treatment of certain types of hypertension.

### 1.2 Summary and Explanation

Renin is an enzyme (Mw of 37 kDa) that belongs to the aspartic acid protease family. Renin is a member of Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) that controls blood pressure, renal blood flux, glomerular filtration, and sodium/potassium homeostasis. Renin is produced constitutively as prorenin, an inactive precursor with 386 amino acids, in the juxtaglomerular cells of the kidney (1). In response to low intra-renal blood pressure, reduced sodium reabsorption, hypokalemia or activity of the sympathetic nervous system, active renin can be released either from a depot in the kidney or generated from prorenin by cleavage of 46 amino acids at the N-terminus of prorenin (2,3). Prorenin secretion into the blood is continuous, in contrast to the tightly controlled release of renin, and blood concentration of prorenin is approx. 100-fold higher than active renin (4,5). After release and activation, soluble renin mediates cleavage of the  $\alpha_2$ -globulin angiotensinogen into the precursor peptide angiotensin I, which ultimately is processed by angiotensin converting enzyme (ACE) to the octapeptide angiotensin II. All actions of angiotensin II are mediated by the G protein-coupled angiotensin type 1 (AT<sub>1</sub>) and angiotensin type 2 (AT<sub>2</sub>) receptors (6). Direct physiological effects of Angiotensin II include vasoconstriction, increase of tubular reabsorption of sodium and chloride, water retention, and release of the hormones aldosterone from adrenal cortex, antidiuretic hormone (ADH, Vasopressin) from posterior pituitary, and adrenocorticotrophic hormone (ACTH, Corticotropin) from anterior pituitary. Release of these hormones further supports sodium retention and secretion of potassium/H<sup>+</sup> in the kidney, and increases thirst sensation and the desire for salt through the subfornical organ of the brain (7,8). In a negative feedback loop, renin secretion is reduced by high concentration of angiotensin II (9), and release of aldosterone is lowered by potassium depletion (10). Beside the action of soluble renin, binding of renin and prorenin to the membrane-bound renin receptor ATP6AP2 in brain, heart, placenta, liver, kidney and pancreas enhances efficiency of angiotensinogen cleavage and induces angiotensin-independent intra-cellular effects by activating mitogen activated kinases ERK1 and ERK2 (11). Plasma renin is a good index for the activity of the RAAS. In case of dysfunction of the RAAS, the Renin assay will allow clinical implications for diagnosis, treatment, and follow up. Active renin should be measured in:

- Diagnosis of hypertension (high blood pressure: if diastolic blood pressure is > 90 mm Hg and systolic blood pressure is > 140 mm Hg; guideline of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension)
- Differential diagnosis of hyperaldosteronism (primary hyperaldosteronism, secondary hyperaldosteronism with or without hypertension, pseudo-hyperaldosteronism)
- Diagnosis of isolated deficit in mineral corticoids
- Differential diagnosis of hypokalemia (secondary hyperaldosteronism or primary hypermineralcorticism)
- Detection of Renin producing tumors in the kidney
- Monitoring of glucocorticoid therapy
- Diagnosis of insufficient response to antihypertensive treatment

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DEMEDIATEC Renin ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle.

The microtiter wells are coated with a monoclonal [mouse] antibody directed towards a unique antigenic site of the human active Renin molecule. An aliquot of patient sample containing endogenous Renin is incubated in the coated well together with Assay Buffer. After incubation, unbound components are washed off. Finally, Enzyme Conjugate, which is a monoclonal anti-Renin antibody conjugated with horseradish peroxidase, is added, and after incubation, unbound enzyme conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase is proportional to the concentration of Renin in the sample.

Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of active Renin in the patient sample.

### 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C – 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 1 N acidic solution. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;  
Wells coated with anti-human Renin antibody (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 vials, (lyophilized); 1 mL  
Concentrations: 0 – 4 – 16 – 32 – 64 – 128 pg/mL  
Conversion: 1 pg/mL = 1.44 µIU/mL  
*The standards are calibrated against WHO 1<sup>st</sup> International Standard for Renin 68/356*  
see "Reagent Preparation"  
Contain non-mercury preservative.
3. **Control Low & High**, 2 vials, (lyophilized); 1 mL  
see „Reagent Preparation“  
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.  
Contain non-mercury preservative.
4. **Assay Buffer**, 1 vial, 20 mL, ready to use,  
Contains non-mercury preservative.
5. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 14 mL, ready to use,  
anti-human Renin antibody (monoclonal); HRP conjugated.  
Contains non-mercury preservative.
6. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,  
Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,  
contains 1 N acidic solution,  
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated),  
see „Preparation of Reagents“.

**Note:** Additional *Assay Buffer* for sample dilution is available upon request.

### 4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Linear graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for six weeks if stored as described above.

#### 4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

##### **Standards**

Reconstitute the lyophilized contents of the standard vial with 1.0 mL distilled water and let stand for 10 minutes in minimum. Mix the standards several times before use.

**Note:** *The reconstituted standards are stable for 14 days at 2 °C - 8 °C. For longer storage freeze at -20 °C.*

##### **Controls**

Reconstitute the lyophilized content with 1.0 mL distilled water and let stand for 10 minutes in minimum. Mix the controls several times before use.

**Note:** *The reconstituted controls are stable for 14 days at 2 °C - 8 °C. For longer storage freeze at -20 °C.*

##### **Wash Solution**

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

*The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.*

#### 4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

#### 4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

### 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA- or heparin plasma) can be used in this assay.

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

*Please note:* Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

Conditions under which samples are collected must be carefully controlled, since a number of physiological factors can influence the renin secretion. These include:

- **Posture:** the patient must have been lying down for more than 1 hour or upright for more than 1 hour
- **Daily Renin oscillations:** sampling is to be done between 7 AM and 10 AM if possible.
- **Diet:** sodium content in the diet must be known and eventually verified by the measurement of natriuria over a period of 24 hours
- **Medication:** the level of active renin can be affected by antihypertensive medication (e.g. diuretics, ACE inhibitors, beta adrenergic blocking agents, vasodilators, renin inhibitors)
- **Pregnancy:** the level of inactive and active renin increases during pregnancy
- **Menstrual cycle:** the level of active renin increases on the second phase of the cycle (sampling is to be done if possible during the first phase)
- **Age:** active renin level decreases with age

##### **NOTE:**

Sera from tumor patients may contain elevated levels of Renin.

## 5.1 Specimen Collection

### Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

### Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

## 5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and *stored at room temperature and NOT stored at 2 °C - 8 °C prior to processing*, since cryoactivation of prorenin may occur in the temperature range of 2 °C - 8 °C, giving false positive active renin values (12,13).

*If samples can not be tested within 4 hours of primary collection, store frozen at -20 °C or below.*

*It is recommended to rapidly freeze and thaw processed samples avoiding the temperature range of 2 °C - 8 °C.*

A dry ice/ethanol bath can be used for rapid freezing procedures.

## 5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Assay Buffer* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### Example:

- a) dilution 1:2: 75 µL sample + 75 µL *Assay Buffer* (mix thoroughly)
- b) dilution 1:5: 30 µL sample + 120 µL *Assay Buffer* (mix thoroughly).

## 6 ASSAY PROCEDURE

### 6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

## 6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **150 µL** of **Assay Buffer** in all wells.
3. Dispense **50 µL** of each **Standard, Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
4. Incubate for **90 minutes** at room temperature on a plate shaker with 300 - 700 rpm.
5. Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells **4 times** with **300 µL** diluted **Wash Solution**. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.  
**Important note:**  
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** in all wells.
7. Incubate for **90 minutes** at room temperature on a plate shaker with 300 - 700 rpm.
8. Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells **4 times** with **300 µL** diluted **Wash Solution**. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
9. Add **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
10. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
11. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
12. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.  
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the **Stop Solution**.

## 6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using linear graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 128 pg/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### 6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

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



## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values. In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DEMEDITEC Renin ELISA the following values are observed in plasma:

	n	Mean (pg/mL)	Median (pg/mL)	99 <sup>th</sup> percentile (pg/mL)	95 <sup>th</sup> percentile (pg/mL)	5 <sup>th</sup> percentile (pg/mL)	1 <sup>st</sup> percentile (pg/mL)
Healthy donors supine position	26	17.72	15.31	35.64	31.90	4.66	2.99
Healthy donors upright position	26	23.95	23.27	47.85	42.30	7.54	3.84

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DEMEDITEC Aldosterone ELISA (DE5298) and the DEMEDITEC Renin ELISA the following *Aldosterone-Renin Ratios* were determined in plasma:

### Ratio Aldosterone Renin (pg/mL / pg/mL)

n	Mean	Median	99 <sup>th</sup> percentile	95 <sup>th</sup> percentile	5 <sup>th</sup> percentile	1 <sup>st</sup> percentile
89	8.68	5.30	49.65	28.06	0.68	0.45

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

## 8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods. After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.81 – 128 pg/mL.

### 9.2 Specificity of Antibodies (Cross-Reactivity)

The following substances were tested for cross-reactivity of the assay:

Mean cross reactivity with Prorenin was 0.71% (mean value when prorenin was spiked in a concentration range from 256 – 4096 pg/mL). However, the observed cross reactivity may only represent a contamination of the recombinant prorenin preparation with active renin due to auto-activation.

Cross-reactivity was not detectable against human serum albumin, human gamma globulin, human hepcidine, and pepsin.

### 9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DEMEDITEC ELISA was calculated by adding 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of the Zero Standard (S0) and was found to be 0.81 pg/mL.

### 9.4 Reproducibility

#### 9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

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

#### 9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

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

### 9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding Renin solutions with known concentrations in a 1:1 ratio. The % recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100 (expected value = (endogenous Renin + added Renin) / 2; because of a 1:2 dilution of plasma with spike material).

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [pg/mL]	16.71	40.21	15.97
Average Recovery	92.92	95.09	96.00
Range of Recovery [%]	from	85.99	87.93
	to	105.47	101.37

### 9.6 Linearity

	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [pg/mL]	45.16	53.20	126.0
Average Recovery	101.7	102.8	98.5
Range of Recovery [%]	from	96.7	95.6
	to	108.6	114.6

## 10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

### 10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 1 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

### 10.2 Drug Interferences

The renin inhibitor aliskiren will increase active renin immunoreactivity in a dose-dependant manner, from 0.54  $\mu$ M (+ 121%) up to 540  $\mu$ M (+151%).

In addition, the level of active renin in plasma may be affected by antihypertensive medication (e.g. diuretics, ACE inhibitors, beta adrenergic blocking agents, or vasodilators)

### 10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test up to 8,200 pg/mL of Renin.

## 11 LEGAL ASPECTS

### 11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

### 11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### 11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

**12 REFERENCES / LITERATURE**

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

## 1 EINLEITUNG

Der **DEMEDIATEC Renin ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von aktivem Renin in humanem Serum oder Plasma eingesetzt. Die Bestimmung von aktivem Renin dient der Diagnose und Behandlung bestimmter Arten von Bluthochdruck. **Nur für In-vitro Diagnostik.**

Das Enzym Renin (Molekulargewicht: 37 kDa) gehört zur Familie der Aspartylproteasen. Renin ist Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS), welches den Blutdruck, den renalen Blutfluss, die glomeruläre Filtrationsrate und die Natrium/Kalium-Homöostase kontrolliert.

Renin wird konstitutiv als Prorenin, ein Vorläuferprotein mit 386 Aminosäuren, in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet (1). Als Antwort auf erniedrigten intrarenalen Blutfluss, verminderte Natriumrückresorption, Hypokaliämie oder unter dem Einfluss des sympathischen Nervensystems wird aktives Renin sowohl aus Depots der Niere freigesetzt, als auch durch Abspaltung von 46 Aminosäuren vom N-Terminus von Prorenin erzeugt (2,3). Während die Sekretion von Prorenin kontinuierlich erfolgt, unterliegt die Freisetzung des aktiven Renins strengen Kontrollmechanismen. Deshalb ist die Plasmakonzentration von Prorenin ungefähr 100-fach höher als die des aktiven Renins (4,5). Nach Freisetzung bzw. Aktivierung bewirkt Renin die Abspaltung des Vorläuferpeptides Angiotensin I aus dem  $\alpha_2$ -Globulin Angiotensinogen. Angiotensin I wird schließlich durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) in das bioaktive Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II entfaltet seine Wirkung durch Aktivierung der G-Protein gekoppelten Angiotensinrezeptoren des Typs 1 ( $AT_1$ ) und des Typs 2 ( $AT_2$ ) (6). Angiotensin II führt direkt zu Vasokonstriktion, zur Zunahme der tubulären Reabsorption von Natrium und Chlorid, zur Wasserretention und zur Freisetzung der Hormone Aldosteron aus der Nebennierenrinde, Antidiuretisches Hormon (ADH, Vasopressin) aus dem Hypophysenhinterlappen, sowie Adrenocorticotropes Hormon (ACTH, Adrenocorticotropin) aus dem Hypophysenvorderlappen. Die Freisetzung dieser Hormone verstärkt die Natriumretention, führt zur Ausscheidung von Kalium und  $H^+$  in der Niere, und induziert durch Stimulation des Subfornikalorgans im Gehirn sowohl das Durstgefühl als auch ein Verlangen nach Salz (7,8). In einer negativen Rückkopplung vermindern hohe Konzentrationen an Angiotensin II die Reninsekretion (9), während eine Kaliumdepletion die Freisetzung von Aldosteron unterdrückt (10). Die Effizienz der Angiotensinogenspaltung wird um ein Vielfaches gesteigert, wenn Renin als auch Prorenin an den membranständigen Reninrezeptor ATP6AP2 binden, der in Gehirn, Herz, Plazenta, Leber, Niere und Pankreas exprimiert wird. Zusätzlich kommt es dadurch zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Kinasen ERK 1 und ERK 2, wodurch weitere, Angiotensin-unabhängige intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden (11).

Aktives Renin im Plasma ist somit ein guter Index für die Aktivität des RAAS. Bei Störungen des RAAS kann die Bestimmung der Konzentration des aktiven Renins die Diagnosestellung unterstützen und die nachfolgende Behandlung überwachen. Renin sollte gemessen werden zur:

- Diagnose von Hypertonie (Bluthochdruck: nach Definition der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie und der Europäischen Gesellschaft für Hypertonie gilt ein systolischer Blutdruck über 140 mmHg oder ein diastolischer Blutdruck über 90 mmHg als Hypertonie)
- Differentialdiagnose des Hyperaldosteronismus (Primärer Hyperaldosteronismus, sekundärer Hyperaldosteronismus mit oder ohne Hypertonie, Pseudo- Hyperaldosteronismus)
- Diagnose eines isolierten Defizits an Mineralkortikoiden
- Differentialdiagnose einer Hypokaliämie (Sekundärer Hyperaldosteronismus oder primärer Hypermineralkortikoismus)
- Detektion von Renin-produzierenden Tumoren der Niere
- Überwachung einer Glukokorticoïdtherapie
- Diagnose bei ungenügendem Ansprechen auf Behandlung einer Hypertonie

## 2 TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC Renin ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert. Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des humanen Renin-Moleküls gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und mit einem Assaypuffer inkubiert. Nicht gebundene Komponenten werden durch Waschen der Wells entfernt. Danach wird das Enzymkonjugat in die Vertiefungen gegeben. Es handelt sich hierbei um einen monoklonalen anti-Renin-Antikörper, welcher an Meerrettichperoxidase gebunden ist. Nicht gebundenes Enzymkonjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben, und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional zur Renin-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

## 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der Stop Solution sollte vermieden werden, da sie 1 N saure Lösung enthält. Saure Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);  
Mit anti-Renin Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen, (lyophilisiert); je 1,0 mL  
Konzentrationen: 0 – 4 – 16 – 32 – 64 – 128 pg/mL  
Umrechnungsfaktor: 1 pg/mL = 1.44 µIU/mL  
*Die Standards sind kalibriert gegen den 1. Internationalen WHO-Standard für Renin 68/356*  
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, (lyophilisiert); 1,0 mL  
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.  
Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Assay Buffer** (Assaypuffer), 1 Fläschchen, 20 mL, gebrauchsfertig;  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
Anti-Renin Antikörper (monoklonal), mit Meerrettichperoxidase konjugiert,  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
Substratlösung TMB.
7. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
enthält 1 N saure Lösung,  
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
8. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;  
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

**Anmerkung:** Zusätzlicher *Assay Buffer* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

### 4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit  $450 \pm 10$  nm Filter),
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.  
Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.  
Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits sechs Wochen ihre Reaktivität.

#### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

##### **Standards**

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Standardfläschchen mit 1,0 mL destilliertem Wasser.  
Achtung: Bei 2 °C bis 8 °C sind die rekonstituierten Standards 14 Tage haltbar. Für eine längere Aufbewahrung bei -20 °C einfrieren.

##### **Control**

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Inhalt der Fläschchen mit 1,0 mL destilliertem Wasser und lassen Sie die Fläschchen mindestens 10 Minuten ruhen. Vor Gebrauch die Kontrolle mehrmals vorsichtig schütteln.

Achtung: Bei 2 °C bis 8 °C sind die rekonstituierten Kontrollen 14 Tage haltbar. Für eine längere Aufbewahrung bei -20 °C einfrieren.

##### **Wash Solution**

Die 40-fach konzentrierte Wash Solution (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

#### 4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Material Sicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

#### 4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

### 5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA- oder, Heparinplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Die Entnahme der Proben muss unter definierten Bedingungen stattfinden, da die Reninkonzentration unter anderem durch folgende Faktoren beeinflusst wird:

- Lage des Patienten: der Patient sollte mehr als eine Stunde entweder in liegender oder stehender Position verbracht haben
- Tageszeitliche Schwankungen der Reninkonzentration: die Probenentnahme sollte wenn möglich immer in der Zeit von 7:00-10:00 Uhr vormittags stattfinden.
- Ernährung: der Natriumgehalt der Nahrung sollte bekannt sein und gegebenenfalls durch die Bestimmung einer Natriurie über einen zeitlichen Verlauf von 24 Stunden bestimmt werden
- Medikamentierung: die Reninwerte können durch Gabe von Antihypertonika beeinflusst werden (z.B. Diuretika, ACE Inhibitoren, Beta-Blocker oder Vasodilatoren, Renin-Inhibitoren)
- Schwangerschaft: die Konzentration an aktivem und inaktivem Renin steigt im Verlauf der Schwangerschaft an
- Menstruationszyklus: die Reninwerte steigen im Verlauf der 2. Phase des Zyklus an; die Probenentnahme sollte deshalb wenn möglich in der 1. Phase des Zyklus erfolgen
- Alter: die Reninwerte nehmen mit zunehmendem Alter ab.

**WICHTIG:** EDTA-Plasma von Tumorpatienten kann erhöhte Reninwerte aufweisen.



## 5.1 Probenentnahme

### Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

### Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulanzen enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

## 5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein.

Die Lagerung der Proben muss bei Raumtemperatur erfolgen. *Eine Lagerung bei 2 °C - 8 °C ist unbedingt zu vermeiden*, da dies zur Kryoaktivierung von Prorenin und in der Folge zu falsch positiven Werten führen kann (12,13).

*Falls die Proben nicht innerhalb von 4 Stunden nach Entnahme getestet werden können, sollten sie bei  $\leq -20$  °C gelagert werden.*

*Das Einfrieren und Auftauen sollte dabei möglichst schnell erfolgen, um den Temperaturbereich von 2 °C - 8 °C möglichst schnell zu überbrücken.*

Ein Gemisch aus Trockeneis und Methanol kann für das beschleunigte Einfrieren der Proben verwendet werden.

## 5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Assay Buffer* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

### Beispiel:

- a) Verdünnung 1:2: 75  $\mu$ L Probe + 75  $\mu$ L *Assay Buffer* (gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:5: 30  $\mu$ L Probe + 120  $\mu$ L *Assay Buffer* (gründlich mischen).

## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

## 6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **150 µL Assay Buffer** in jedes Well geben.
3. Je **50 µL Standards, Controls** und Proben mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells geben.
4. **90 Minuten** bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 300 - 700 U/min inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.  
Wells **4-mal** mit verdünnter **Wash Solution (300 µL)** waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
6. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
7. **90 Minuten** bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit 300 - 700 U/min inkubieren.
8. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.  
Wells **4-mal** mit verdünnter **Wash Solution (300 µL)** waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
9. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
10. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
11. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
12. Die Optische Dichte bei **450 ± 10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.

## 6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.
- 6.

### 6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DEMEDITEC ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	0,09
Standard 1 (4 pg/mL)	0,19
Standard 2 (16 pg/mL)	0,44
Standard 3 (32 pg/mL)	0,78
Standard 4 (64 pg/mL)	1,14
Standard 5 (128 pg/mL)	2,48

## 7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DEMEDITEC Renin ELISA folgende Werte in Plasma:

	n	Mittelwert (pg/mL)	Median (pg/mL)	99. Perzentil (pg/mL)	95. Perzentil (pg/mL)	5. Perzentil (pg/mL)	1. Perzentil (pg/mL)
Gesunde Probanden liegende Position	26	17,72	15,31	35,64	31,90	4,66	2,99
Gesunde Probanden aufrechte Position	26	23,95	23,27	47,85	42,30	7,54	3,84

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DEMEDITEC Aldosterone ELISA (EIA 5298) und dem DEMEDITEC Renin ELISA folgende *Aldosteron-Renin-Quotienten* in Plasma:

### Aldosteron-Renin-Quotienten (pg/mL/pg/mL)

n	Mittelwert	Median	99. Perzentil	95. Perzentil	5. Perzentil	1. Perzentil
89	8,68	5,30	49,65	28,06	0,68	0,45

## 8 QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden. Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

## 9 ASSAY CHARACTERISTIKA

### 9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,81 – 128 pg/mL.

### 9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### 9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung des *Standards 0* (n = 20), beträgt 0,81 pg/mL.

Die Daten zu:

### 9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

### 9.5 Wiederfindung

### 9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## 10 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

### 10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 1 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

### 10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Der Renin-Hemmer Aliskiren erhöht die Immunreaktivität des aktiven Renins in konzentrationsabhängiger Weise von 0,54  $\mu$ M (+ 121%) bis zu 540  $\mu$ M (+151%).

Die Reninwerte in humanem Plasma können durch Gabe von Antihypertonika beeinflusst werden (z.B. Diuretika, ACE Inhibitoren, Beta-Blocker oder Vasodilatoren).

### 10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt bei Proben mit bis zu 8.200 pg/mL Renin nicht auf.

## 11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

### 11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

### 11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1, genannten Voraussetzungen übereinstimmen.

Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### 11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2, erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## 12 REFERENZEN / LITERATUR

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## 1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **DEMEDIATEC Renin ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di Renina attiva in siero e plasma umano.

**Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.**

## 2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit DEMEDIATEC Renin ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA) basato sul principio sandwich.

I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo monoclonale (topo) diretto contro un unico sito antigenico della molecola di renina attiva umana. Un'aliquota del campione del paziente contenente renina endogena è incubata nei pozzetti ricoperti assieme al tampone del test. Dopo l'incubazione, i componenti non legati sono lavati via. Finalmente, il tracciante enzimatico, che è un anticorpo monoclonale anti-renina coniugato alla perossidasi di rafano viene aggiunto e, dopo l'incubazione, il tracciante non legato viene lavato via.

La quantità della perossidasi legata è proporzionale alla concentrazione Renina nel campione.

Dopo l'aggiunta della soluzione substrato, l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di Renina nel campione del paziente.

## 3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 1 N acido soluzione. L'acido soluzione può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati immagazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta Demeditec Diagnostics GmbH.

## 4 COMPONENTI DEL KIT

### 4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti;  
Pozzetti ricoperti con l'anti-Renina (umano) anticorpo (monoclonale)
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 flaconi (liofilizzati), 1 mL;  
Concentrazione: 0 – 4 – 16 – 32 – 64 – 128 pg/mL  
Conversione: 1 pg/mL = 1.44  $\mu$ IU/mL  
*Gli standard sono calibrati contro lo Standard Internazionale WHO 1<sup>st</sup> per Renina IRP (68/356).*  
Vedi "preparazione dei reagenti".  
Contiene conservante senza mercurio.
3. **Control Low & High** (Controllo), 2 flaconi, (liofilizzato), 1 mL  
vedi „preparazione dei reagenti“  
I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei flaconi o sulla descrizione QC.  
Contiene conservante senza mercurio.
4. **Assay Buffer** (Tampone del test), 1 flacone, 20 mL, pronto all'uso.  
Contiene conservante senza mercurio.
5. **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso  
Anti-Renina (umano) anticorpo coniugato alla perossidasi di rafano  
Contiene conservante senza mercurio.
6. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;  
TMB (benzidine tetrametilico).
7. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;  
contiene 1 N acido soluzione. Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
8. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X);  
vedi „preparazione dei reagenti“.

**Nota:** Ulteriore *Assay Buffer* per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

### 4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti ( $450 \pm 10$  nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.

### 4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

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

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

Test kits aperti rimangono attivi per 6 settimane se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

#### 4.4 Preparazione dei reagenti

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

##### **Standards**

Ricostituire il contenuto liofilizzato dei flaconi con gli standard con 1,0 mL acqua distillata.

**Nota:** *Gli standard ricostituiti sono stabili per 14 giorni a 2 °C a 8 °C.*

*Per periodi piu' lunghi congelare a -20 °C.*

##### **Control**

Ricostituire il contenuto liofilizzato con 1,0 mL acqua distillata e far riposare per almeno 10 minuti.

Mescolare alcune volte prima dell'uso.

**Nota:** *I controlli ricostituiti sono stabili 14 giorni a 2 °C a 8 °C.*

*Per periodi piu' lunghi congelare a -20 °C.*

##### **Wash Solution**

Diluire 30 mL *Wash Solution* concentrata con 1170 mL di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 mL.

*La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.*

#### 4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

#### 4.6 Test kits danneggiati

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

### 5 CAMPIONI

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

Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

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

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

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

##### **NOTA:**

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

## 5.1 Collezione dei campioni

### Siero:

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

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

### Plasma:

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

## 5.2 Magazzinaggio dei campioni

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

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

*Si raccomanda di congelare e scongelare i campioni evitando il campo di temperatura di 2 °C - 8 °C. Un bagnomaria di ghiaccio secco ed etanolo può' essere usato per un congelamento rapido.*

## 5.3 Diluizione dei campioni

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

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

### Esempio:

- a) diluizione 1:2: 75 µL siero + 75 µL *Assay Buffer* (agitare bene)
- b) diluizione 1:5: 30 µL della diluizione a) + 120 µL *Assay Buffer* (agitare bene).

## 6 ATTUAZIONE DEL TEST

### 6.1 Indicazioni generali

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



## 6.2 Esecuzione del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

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

## 6.3 Rilevamento dei risultati

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

### 6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

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

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	0,09
Standard 1 (4 pg/mL)	0,19
Standard 2 (16 pg/mL)	0,44
Standard 3 (32 pg/mL)	0,78
Standard 4 (64 pg/mL)	1,14
Standard 5 (128 pg/mL)	2,48

## 7 VALORI NORMALI

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

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

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

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DEMEDITEC Aldosterone ELISA (DE5298) e il test DEMEDITEC Renin ELISA, i seguenti *quozienti aldosterone-renina* sono stati ottenuti nel plasma:

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

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

## 8 CONTROLLO QUALITÀ

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

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

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

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

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

## 9 CARATTERISTICHE DEL TEST

### 9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0,81 – 128 pg/mL.

### 9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

### 9.3 Sensitività analitica

La sensitività *analitica* è stata calcolata dai valori medi più due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Zero Standard* ed erano 0,81 pg/mL.

### 9.4 Precisione

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

### 9.5 Ritrovato

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

### 9.6 Linearità

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

## 10 LIMITAZIONE DEL TEST

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

### 10.1 Sostanze interferenti

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

### 10.2 Droghe interferenti

L'inibitore della renina "Aliskiren" causa un'innalzamento della immunoreattività della renina attiva in maniera dosis-dipendente, da 0,54  $\mu$ M (+ 121%) fino a 540  $\mu$ M (+151%). Il livello di renina attiva nel plasma può essere affetto da medicazione anti-ipertensiva (p.es. Diuretici, inibitori ACE, bloccatori beta adrenergici o vasodilatatori).

### 10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

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

## 11 ASPETTI LEGALI

### 11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DEMEDITEC.

### 11.2 Conseguenze terapeutiche

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

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

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

### 11.3 Responsabilità legali

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

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

## 12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

## 1 INTRODUCCIÓN

El **Kit de inmunoensayo enzimático DEMEDITEC Renin** proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa de Renina activa en suero y plasma humano.

**Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico *in vitro*.**

## 2 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit DEMEDITEC Renin ELISA es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio del sándwich.

Las placas multipocillo están recubiertas de anticuerpo monoclonal de ratón que se une a un único antígeno de la molécula de Renina humana activa.

Se incubaba una alícuota de la muestra del paciente que contiene Renina endógena junto con el tampón de ensayo en el pocillo recubierto.

Después de la incubación, los componentes no unidos se lavan.

Finalmente, el Enzima conjugado, que es un anticuerpo monoclonal anti-Renina conjugado con peroxidasa de rábano, se añade, y después de la incubación, el Enzima conjugado no unido se lava.

La cantidad de peroxidasa unida es proporcional a la concentración de Renina en la muestra.

Cuando se añade la solución del sustrato de la peroxidasa, la intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de Renina en la muestra del paciente.

## 3 PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene acido solucion 1 N. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a Demeditec Diagnostics GmbH..

## 4 COMPONENTES DEL KIT

### 4.1 Componentes del Kit

1. **Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti- Renina humana (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0-5)**, (Estándar), 6 viales (lío-filizados), 1 mL; Concentraciones: 0 – 4 – 16 – 32 – 64 – 128 pg/mL  
Conversión: 1 pg/mL = 1.44 µIU/mL  
Los estándares están calibrados según *WHO 1<sup>st</sup> International Standard para Renina 68/356*  
Ver “Preparación de los Reactivos”;  
Contiene conservante sin mercurio..
3. **Control Low & High**, 2 viales (lío-filizado), 1 mL,  
ver “Preparación de los Reactivos”  
Referir los valores y rangos del control a la etiqueta del vial o a la Hoja de datos QC.  
Contiene conservante sin mercurio.
4. **Assay Buffer** (Tampón de ensayo), 1 vial, 20 mL, listo para usar,  
Contiene conservante sin mercurio.
5. **Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 14 mL, listo para usar,  
Anticuerpo anti- Renina humana conjugado con la Peroxidasa de rábano;  
Contiene conservante sin mercurio..
6. **Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar,  
Tetrametilbencidina (TMB).
7. **Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar,  
contiene 1 N ácido solución,  
Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
8. **Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X),  
ver “Preparación de los Reactivos”.

**Nota:** Se puede solicitar el *Assay Buffer* para la dilución de la muestra.

### 4.2 Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 ± 10 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

### 4.3 Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante 6 meses si se almacenan como se ha descrito arriba.

#### 4.4 Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

##### **Standards**

Reconstituir el contenido liofilizado de los viales de los estándares con 1 mL de agua destilada y dejar reposar como mínimo durante 10 minutos. Mezclar el control varias veces antes de usar.

**Nota:** *Los estándares reconstituidos son estables durante 14 días a 2 °C - 8 °C.  
Para períodos más largos congelar a -20 °C.*

##### **Control**

Reconstituir el contenido liofilizado con 1 mL de agua destilada y dejar reposar como mínimo durante 10 minutos. Mezclar el control varias veces antes de usar.

**Nota:** *El control reconstituido es estable durante 14 días a 2 °C - 8 °C.  
Para períodos más largos congelar a -20 °C.*

##### **Wash Solution**

Mezclar 30 mL de *Wash Solution* concentrada con 1170 mL de agua desionizada hasta un volumen final de 1200 mL.

*La solución del lavado diluida es estable durante 2 semanas a temperatura ambiente.*

#### 4.5 Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

#### 4.6 Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DEMEDITEC, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

### 5 MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero o plasma (plasma EDTA o Heparina).

No usar muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas.

Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

Las condiciones de obtención de muestras deben ser controladas con precaución ya que la secreción de renina puede ser influenciada por una serie de factores fisiológicos. Entre ellos se incluyen:

- La postura: el paciente ha de haber estado tumbado durante más de una hora o erguido durante más de una hora.
- Oscilaciones de los niveles de renina diarios: las muestras deben tomarse entre las 7 AM y las 10 AM si es posible.
- Dieta: el contenido en sodio de la dieta debe ser conocido y eventualmente verificado midiendo la natriuria a lo largo de un período de 24 horas
- Medicación: el nivel de renina activa puede ser afectado por medicación antihipertensiva (ej. diuréticos, inhibidores ACE, agentes bloqueadores beta- adrenérgicos o vasodilatadores)
- Embarazo: los niveles de renina inactiva y activa aumentan durante el embarazo
- Ciclo menstrual: los niveles de renina activa aumentan en la segunda fase del ciclo (si es posible, la obtención de muestras ha de realizarse durante la primera fase)
- Edad: los niveles de renina activa disminuyen con la edad

##### **NOTA:**

Suero de pacientes con tumores pueden contener niveles elevados de Renina.

## 5.1 Toma de muestras

### Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

### Plasma:

Toda la sangre ha de recogerse en tubos de centrífuga que contengan anticoagulante (Ej. Sarstedt Monovette con una preparación adecuada para el plasma) y centrifugar inmediatamente tras la recogida.

## 5.2 Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y almacenadas *a temperatura ambiente* y **NO** a 2 °C - 8 °C *antes de su procesamiento*, ya que puede ocurrir la crioactivación de pro-renina a temperaturas entre 2 °C - 8 °C, dando valores falsos positivos de renina activa (12,13)

*Si las muestras no pueden analizarse en las primeras 4 horas desde su recolección, almacenar congeladas a 20 °C o menos.*

*Se recomienda congelar y descongelar rápidamente las muestras procesadas evitando el rango de temperaturas entre 2 °C - 8 °C*

Un baño de hielo seco/etanol puede usarse para congelado rápido.

## 5.3 Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar más concentrado, ha de diluirse con *Assay Buffer* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

### Ejemplo:

- a) dilución 1:2: 75 µL plasma + 75 µL *Assay Buffer* (mezclar totalmente)
- b) dilución 1:5: 30 µL plasma + 120 µL *Assay Buffer* (mezclar totalmente).

## 6 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

### 6.1 Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

## 6.2 Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **150 µL** de **Assay Buffer** a cada pocillo
3. Dispensar **50 µL** de cada **Standard, Control** y **muestras** con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
4. Incubar durante **90 minutos** a temperatura ambiente en un agitador de placas a 300 -700 rpm.
5. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.  
Lavar los pocillos **4 veces** con **Wash Solution** diluida (300 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

### Nota importante:

La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!

6. Dispensar **100 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo.  
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
7. Incubar durante **90 minutos** a temperatura ambiente en un agitador de placas a 300 - 700 rpm.
8. Sacudir enérgicamente el contenido de los pocillos.  
Lavar los pocillos **4 veces** con **Wash Solution** diluida (300 µL por pocillo). Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.
9. Adicionar **100 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
10. Incubar durante **15 minutos** a temperatura ambiente.
11. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
12. Leer la OD a **450 ± 10 nm** con un lector de microplacas **dentro de los 10 minutos** después de la adición de la **Stop Solution**.

## 6.3 Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de absorbancia media para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la absorbancia media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de absorbancia media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en la IFU se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 PL (4 Parámetros Logísticos). Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de la muestra puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

### 6.3.1 Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Unidades Ópticas (450 nm)
Standard 0 (0 pg/mL)	0,09
Standard 1 (4 pg/mL)	0,19
Standard 2 (16 pg/mL)	0,44
Standard 3 (32 pg/mL)	0,78
Standard 4 (64 pg/mL)	1,14
Standard 5 (128 pg/mL)	2,48



## 7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DEMEDITEC Renin ELISA se observaron los siguientes valores en plasma:

	n	media (pg/mL)	mediana (pg/mL)	99. percentil (pg/mL)	95. percentil (pg/mL)	5. percentil (pg/mL)	1. percentil (pg/mL)
Donantes sanos en posición supina	26	17,72	15,31	35,64	31,90	4,66	2,99
Donantes sanos en posición erecta	26	23,95	23,27	47,85	42,30	7,54	3,84

En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DEMEDITEC Aldosterone ELISA (DE5298) y el DEMEDITEC Renin ELISA se observaron los siguientes cocientes Aldosterona-Renina en plasma:

### Quozienti Aldosterona-Renina (pg/mL / pg/mL)

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

## 8 CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados.

Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados.

Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos.

En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DEMEDITEC directamente.

## 9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

### 9.1 Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,81 – 128 pg/mL.

### 9.2 Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

### 9.3 Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media mas dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del *Zero Standard* y resultó ser 0,81 pg/mL

### 9.4 Precisión

Consultar el manual de usuario en inglés.

### 9.5 Recuperación

Consultar el manual de usuario en inglés.

### 9.6 Linealidad

Consultar el manual de usuario en inglés.

## 10 LIMITACIONES DE USO

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

### 10.1 Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 1 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0.5 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 30 mg/mL) no influyen los resultados del ensayo.

### 10.2 Interferencias con drogas

El Renin-Inhibidor "Aliskiren" va a aumentar la inmunoreactividad de la Renina activa dependiente de la dosis, del 0,54  $\mu$ M (+ 121%) hasta el 540  $\mu$ M (+151%).

El nivel de renina activa en plasma puede ser afectado por medicación antihipertensiva (ej. diuréticos, inhibidores ACE, agentes bloqueadores beta- adrenérgicos o vasodilatadores).

### 10.3 Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo hasta 8200 pg/mL de Renina.

## 11 ASPECTOS LEGALES

### 11.1 Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo.

Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DEMEDITEC.

### 11.2 Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

### 11.3 Responsabilidad











Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

## 12 REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA

Consultar el manual de usuario en inglés.

## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostique in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr,	Référence	Número de catálogo	No, di Cat,
	Lot, No, / Batch code	Chargen-Nr,	No, de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No,</i>	Volume / No,	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de microtitration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Zero Standard	Estándar cero	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante