



ACE kinetic

Angiotensin Converting Enzyme

KK-ACK	100 tests
KK-ACK2	2 x 50 tests
KK-ACK4	400 tests
KK-ACKX	1200 tests

Revision date: 2012-11-26

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN ACE kinetic test is intended for the direct and quantitative *in vitro* diagnostic determination of angiotensin converting enzyme (ACE) activity in serum by an enzymatic assay.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

ACE catalyses the conversion of angiotensin I to angiotensin II. The enzyme also mediates the cleavage of the synthetic substrate (FAPGG) into an amino acid derivative and a dipeptide. The kinetic of this cleavage reaction is measured by recording the decrease in absorbance at 340 nm (1,2). The ACE kinetic method is standardized with the BÜHLMANN ACE colorimetric kit according to the reference method described in 3 and 4.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity			Code	Reconstitution
	KK-ACK/ KK-ACK4	KK-ACK2	KK-ACKX		
Substrate	1 vial/ 4 vials 26 ml	2 vials 13 ml	3 vials 100 ml	B-ACK-SUB B-ACK2-SUB ¹ B-ACKX-SUB ²	Ready to use
Calibrator ³	1 vial/ 2 vials	2 vials	3 vials	B-ACK-CA	add 2 ml of sterile water
Controls ⁴ Normal and High	1x2 vials/ 2x2 vials	2x2 vials	3x2 vials	B-ACK-CONSET	add 2 ml of sterile water

Table 1

¹ Order Codes for KK-ACK2.

² Order Codes for KK-ACKX.

³ Lyophilized ACE Calibrator in a protein serum matrix with lot specific activity. After reconstitution leave for 15 minutes at 18-28°C and mix well before use. The Calibrator has been standardized with the BÜHLMANN ACE colorimetric kit (*cf.* above).

⁴ Lyophilized ACE Normal and High Controls in a protein serum matrix with lot specific activity. Reconstitute for 15 minutes at 18-28°C and mix well before use.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
Stable at 2-8°C until expiration date printed on the label	
Opened / Reconstituted Reagents	
Substrate	Stable until exp. date at 2-8°C
Calibrator	Stable for 6 months at 2-8°C
Controls	

Table 2

PRECAUTIONS

SAFETY PRECAUTIONS

- Calibrator and controls of this kit contain components of human origin. Although tested and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies, the reagents should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions.
- Unused solution should be disposed of according to local State and Federal regulations.

TECHNICAL PRECAUTIONS

Kit components

- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected, if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.

- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Let the reagents adjust to reach room temperature. Reconstitute the lyophilized reagents as indicated. Mix well (vortex) the reagents before use.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes: 25, 100, 150, 250 µl and 2 ml
- Plastic test tubes for sample or calibrator incubation
- Vortex mixer
- Waterbath for incubation set at 37°C
- Spectrophotometer with temperature controlled cuvette holders for incubation at 37°C and for measurement of absorbance at 340 nm
- Clinical chemistry analyser with 340 nm filter (optional)

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Since EDTA inhibits ACE activity, serum specimen should be used for the determination of ACE activity.

Collect sufficient blood (at least 0.5 ml) by venipuncture into an appropriate tube without anticoagulant. coagulate for 2-3 hours at room temperature, centrifuge at 4°C and 1000 x g and collect the serum. Freeze the serum specimen at -20°C if not assayed within 5 days. ACE activity in sterile serum is stable for up to 30 days at 2-8°C and 6 months at -20°C.

To avoid lipemic sera, blood samples should be taken from fasting patients.

ASSAY PROCEDURE

Assay Protocol (For automatic procedure *cf.* next chapter below)

Allow the substrate to reach room temperature. Avoid heating of the substrate. Pretreat all lipemic sera according to the procedure described above.

1. Label two plastic tubes for calibrator and controls and samples.
 2. Pipet 25 µl of Calibrator, Control serum and patient sample, respectively, into the corresponding tubes.
- NOTE:** The measurement of the enzyme activity as described below has to be started according to the capacity of the respective photometer.
3. Add 250 µl of substrate to each sample and vortex thoroughly.
 4. Incubate for 5 minutes at 37°C in a water bath.
 5. Blank your photometer with distilled water.

6. Transfer Calibrators, Controls and samples into a microcuvette, incubate them at 37°C and measure the samples twice at an interval of exactly 10 minutes at 340 nm.

STANDARDIZATION

The results obtained using this assay is identical to the values obtained with the standard BÜHLMANN ACE colorimetric assay. The ACE kinetic (KK-ACK) is standardized against the reference method established by Lieberman (3).

RESULTS AND AUTOMATION

Automation with Clinical Analysers

ACE kinetic can be performed on every open chemistry analyser. Bühlmann will assist you to adapt your instrument settings. In order to guarantee equivalent kinetic characteristics between manual and automated version we recommend using the volumes and/or ratios established for

the manual version. For instructions on programming and operation please refer to the "Operators Manual" of the Instrument. We also advise that each laboratory should evaluate the assay performance on their instrument.

PARAMETER SETTINGS FOR SEVERAL CLINICAL CHEMISTRY ANALYSERS ARE AVAILABLE UPON REQUEST.

CALCULATION

Calculate the corresponding enzyme activity (E_x) of each unknown sample by dividing the difference in absorbance of the individual sample (ΔA_x) through the mean of the absorbance difference of the calibrator vial (ΔA_c) and multiply the results by the enzyme activity (E_c) indicated on the data sheet (for an example see Table 11):

$$E_x = \frac{\Delta A_x}{\Delta A_c} \times E_c$$

Automated procedure: For calculation of results use the RATE mode. Refer to the instrument manual for further details.

Definition: One unit of ACE activity is defined as the amount of enzyme required to release one μmol of Hippuric Acid per minute and per liter of serum at 37°C as determined by the colorimetric assay:

$$1 \text{ ACE unit} = \frac{1 \mu\text{mol hippuric acid}}{\text{min} \times \text{L}} = 1 \text{ U/l}$$

QUALITY CONTROL

The values of the Normal and High Controls provided with the kit must be within the lot specific range indicated on the corresponding data sheet. Otherwise, the assay has to be repeated.

It is good laboratory practice to record the following data for each assay: kit lot number, reconstitution dates of kit components, concentration value of calibrator and controls, concentration values of internal serum pool.

PERFORMANCE LIMITATIONS

- Due to interference with the photometric determination, lipemic sera must be pretreated either with an Ultracentrifuge or with LipoClear from StatSpin Inc. (www.statspin.com). Icteric or hemolytic sera can not be used for ACE activity determination.
- Test results should be interpreted in conjunction with information available from clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision: 2.7%. The intra-assay precision has been determined by measuring three different serum samples 20 times in a single test run (cf. Table 12).

Inter-Assay Precision: 8.1%. The inter-assay precision has been determined by measuring three control serum samples in 20 consecutive runs (cf. Table 13).

Dilution Linearity: 108.9%. 14 serum samples with elevated ACE activity (range: 100-172 U/l) have been diluted with physiological NaCl solution from 1:1 up to 1:32 in various runs. In total 140 values has been analysed. The median value of dilution linearity (observed vs. expected) is 108.9% and the 5-95th percentile is 90 to 137% (cf. Table 14 and Figure 1). The kinetic method is linear up to at least 150 U/l.

Spiking Recovery: 99.8%. Two different serum samples have been spiked with increasing amounts of ACE and analyzed according to the assay procedure (cf. Table 15).

Detection limit (LoB)<5 U/l. The analytical sensitivity is dependent on the precision of the clinical chemistry analyser used. By repeated measurements with water (blank reagent) the imprecision of the analyser was determined by calculating the mean +3 SD value and converted it into ACE U/l.

For Cobas Mira the instrument detection limit is calculated as 2.5 U/l ($n=100$) and for the Kone T30 analyser as 3.6 U/l ($n=33$).

Detection limit (LoQ): ~12 U/l. The functional sensitivity was determined by repeated measurements ($n=356$) of a series of sera ($n=45$) with medium to low activity (range: 1.5-35.5 U/l). The ACE activity at 20 %CV was determined to be 12 U/l.

Specificity: Inhibition by its natural substrate Ang I and by EDTA and H-Val-Trp-OH. A serum sample of defined ACE activity has been inhibited and measured again (cf. Table 16).

REFERENCE INTERVALS

The serum ACE activity strongly depends on the genotype of the patients investigated (5). Therefore, reference values depend on the genetic pattern of the donors and differences can be explained by the frequency of the three genotypes within group of donors on investigation.

From a group of **80 adult** (age 20-70 years) normal blood donors from Switzerland, a reference range (2.5-97.5th Percentile) has been determined to be (cf. Table 17):

20 – 70 U/l

In a study 159 Caucasian volunteers, classified as apparently healthy by a medical examination, were tested for ACE activity. No correlation between serum ACE activity and age could be detected. A median value of 45.1 U/l and a normal range (2.5th -97.5th Percentile) of 16 – 85 U/l was described (5)

In a study with 50 sarcoidosis patients, serum ACE levels were within a range of 45-135 U/l (6).

Serum ACE levels in children are substantially higher and more variable than in adults (5). Elmlinger et al. (Children's Hospital, Tübingen, Germany), examined **84 children** from 6 months to 18 years to estimate serum ACE reference range. A normal serum range (2.5-97.5th Percentile) has been determined to be (cf. Table 17):

29 – 112 U/l

No significant differences have been observed by splitting into gender or age categories. In Newborns (0 to 6 months) very low ACE activity has been detected (Data not shown).

METHOD COMPARISON

80 sera from apparently healthy donors (see above) were analyzed with the three different assays from Bühlmann AG. The results from ACE kinetic assay, ACE colorimetric and ACE direct radioenzymatic were correlated:

ACE kinetic = $1.065 \times \text{ACE colorimetric} - 6.05 \text{ U/l}$;
 $r = 0.94$; $R^2 = 0.88$

ACE kinetic = $1.368 \times \text{ACE direct} - 13.96 \text{ U/l}$;
 $r = 0.94$; $R^2 = 0.89$

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der BÜHLMANN ACE kinetic Test wird für die direkte und quantitative *in vitro* diagnostische Bestimmung der Angiotensin-Converting Enzym (ACE) Aktivität im Serum mittels enzymatischer Nachweismethode gebraucht.

PRINZIP DER METHODE

ACE katalysiert die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II. Das Enzym verursacht ebenfalls die Spaltung eines synthetischen Substrats (FAPGG) in ein Aminosäurederivat und ein Dipeptid. Die Kinetik dieser Abspaltung kann durch die Messung der Abnahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm erfasst werden (1,2). Die ACE kinetic Methode wird mit Hilfe des BÜHLMANN ACE colorimetric Kits standardisiert. Diese entspricht der Methode, welche in den Literaturreferenzen 3 und 4 beschrieben wird.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Inhalt			Art.-Nr.	Rekonstitu-tion
	KK-ACK/ KK-ACK 4	KK- ACK2	KK-ACKX		
Substrat	1 Fl./ 4 Fl. 26 ml	2 Fl. 13 ml	3 Fl. 100 ml	B-ACK-SUB B-ACK2-SUB ¹ B-ACKX-SUB ²	Gebrauchs-fertig
Kalibrator ³	1 Fl./ 2 Fl.	2 Fl.	3 Fl.	B-ACK-CA	2 ml steriles Wasser
Kontrolle ⁴ Normal und Hoch	1x2 Fl./ 2x2 Fl.	2x2 Fl.	3x2 Fl.	B-ACK- CONSET	2 ml steriles Wasser

Tabelle 3

¹ Art.-Nr. für KK-ACK2.

² Art.-Nr. für KK-ACKX.

³ Lyophilisierter ACE Kalibrator in einer Protein-Serum-Matrix mit Lot-spezifischer Aktivität. Nach Rekonstitution für 15 Minuten bei 18-28°C stehen lassen und vor Gebrauch gut mischen. Der Kalibrator wurde mit Hilfe des BÜHLMANN ACE colorimetric Kits (siehe oben) standardisiert.

⁴ Lyophilisierte ACE Kontrolle Normal und Hoch in einer Protein-Serum-Matrix mit Lot-spezifischer Aktivität. Nach Rekonstitution für 15 Minuten bei 18-28°C stehen lassen und vor Gebrauch gut mischen.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Zu verwenden bis zum angegebenen Verfallsdatum auf der Packungsetikette. Lagerung bei 2-8°C.	
Geöffnete / Rekonstituierte Reagenzien	
Substrat	Zu verwenden bis zum Verfallsdatum. Lagerung bei 2-8°C
Kalibrator	Zu verwenden bis 6 Monate nach Rekonstitution. Lagerung bei 2-8°C
Kontrollen	

Table 4

VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Kalibrator und Kontrollen enthalten Komponenten menschlicher Herkunft. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten gemäss Good Laboratory Practice als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.
- Ungebrauchte Lösungen sollten gemäss der gesetzlichen Bestimmungen entsorgt werden.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- Lesen Sie die Arbeitsanleitung sorgfältig vor der Testdurchführung. Die Testqualität kann negativ beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder

verändert werden sowie nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.

- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Kit lots.
- Lassen Sie die Reagenzien auf Raumtemperatur äquilibrieren. Lösen Sie lyophilisierte Reagenzien wie angegeben auf. Reagenzien vor Gebrauch gut mischen (vortexen).

FORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten für 25, 100, 150, 250 µl und 2ml
- Plastikröhrchen
- Bidestilliertes bzw. steriles Wasser
- Wirbelmischer (Vortex)
- Wasserbad 37°C
- Spektralphotometer 340 nm, Filterphotometer 342 nm oder klin. chem. Analyser mit temperierbarem Küvetten-Halter (37°C Inkubation und Messung)

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Die ACE-Bestimmung kann nur in Serum durchgeführt werden. Der Zusatz von EDTA bei der Blutentnahme blockiert die ACE-Aktivität:

- Mindestens 0.5 ml Blut durch Venenpunktion in einem entsprechenden Röhrchen ohne Antikoagulanzen sammeln.
- Röhrchen nach 2-3 Std. bei Raumtemperatur in einer Kühlzentrifuge zentrifugieren.

Werden die Serumproben innerhalb von 5 Tagen bearbeitet, können sie bis dahin im Kühlschrank bei 2-8°C gelagert werden (bei sterilen Seren ist sogar eine Lagerung bei 2-8°C während 30 Tagen möglich). Die ACE-Aktivität bleibt bei -20°C für 6 Monate erhalten.

Um lipämische Seren zu vermeiden, sollen die Blutproben von nüchternen Patienten abgenommen werden.

ARBEITSANLEITUNG

Testansatz und Durchführung (für automatisierte Durchführung siehe unten)

Die Reagenzien und Seren rechtzeitig aus dem Kühlschrank entnehmen und langsam auf Raumtemperatur erwärmen lassen. Das Erhitzen des Substrates sollte vermieden werden. Lipämische Seren müssen vorbehandelt werden (siehe oben).

1. Jeweils 2 Plastikröhrchen für Kalibrator und Kontrollen (Normal/Hoch) beschriften. Für jede Patientenprobe ein weiteres Röhrchen beschriften.
2. Jeweils 25 µl Kalibrator, Kontrollen und Patientenproben in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.

HINWEIS: Ausgehend von der Kapazität des Photometers gelten die nachfolgenden Arbeitsschritte für jede individuelle Probe.

3. 250 µl Substrat in jedes Röhrchen pipettieren und gründlich mischen (Vortex).
4. Im Wasserbad bei 37°C für 5 Minuten inkubieren.
5. Das Photometer mit destilliertem Wasser auf Null kalibrieren.
6. Die Probe in eine Mikroküvette transferieren und bei 37°C bei 340 nm messen. Eine zweite Messung wird nach exakt 10 Minuten durchgeführt.

STANDARDISIERUNG

Der ACE kinetic (KK-ACK) wurde gegen die Referenzmethode von Lieberman (3) standardisiert. Die Testresultate sind identisch mit den Werten welche man mit dem Standard BÜHLMANN ACE colorimetric Test erhält.

RESULTATE UND AUTOMATISIERUNG

Automatisierung mittels Klinisch-Chemischen Analysegeräten

Der ACE kinetic Test kann auf jedem offenen Klinisch-Chemischen Analysegerät durchgeführt werden. Bühlmann unterstützt Sie bei der Adaption der Instrumenteneinstellungen. Um die gleichen kinetischen Eigenschaften zu garantieren, empfehlen wir, die in der Handmethode angegebenen Volumen und/oder Verhältnisse in der automatisierten Methode zu übernehmen. Für die Programmierung und die Handhabung soll das jeweilige Instrumenten-Handbuch verwendet werden. Ebenfalls empfehlen wir, dass jedes Labor die Leistungsmerkmale des Tests auf Ihrem Analysegerät erhebt.

EINGABE-PROTOKOLLE STEHEN FÜR VERSCHIEDENE KLINISCH-CHEMISCHEN ANALYSEGERÄTEN AUF ANFRAGE ZUR VERFÜGUNG.

BERECHNUNG DER RESULTATE

Die Enzymaktivität (E_x) einer unbekannten Patientenprobe wird berechnet, indem die Differenz aus der ersten und zweiten Messung (ΔA_x) durch diejenige Differenz (Mittelwert) des Kalibrators (ΔA_c) dividiert wird. Das Resultat wird mit der Enzymaktivität des Kalibrators (E_c ; Lot-spezifisch, siehe Datenblatt) multipliziert (Table 11).

$$E_x = \frac{\Delta A_x}{\Delta A_c} \times E_c$$

Automatisierte Methode: Um die Resultatberechnung durchzuführen muss der RATE Modus verwendet werden. Für weitere Informationen soll das Instrumenten-Handbuch zugezogen werden.

Definition: eine Einheit (Unit) der ACE Aktivität ist als die Enzymmenge definiert, welche 1 μmol Hippursäure pro Minute und pro Liter Serum bei 37°C freisetzt:

$$1 \text{ ACE unit} = \frac{1 \mu\text{mol Hippursäure}}{\text{min} \times \text{L}} = 1 \text{ U/l}$$

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Werte der Normal und der Hoch Kontrolle, welche mit dem Kit mitgeliefert wurden, müssen sich im Lot-spezifischen Bereich befinden welche auf dem entsprechenden Datenblatt angegeben werden. Trifft dies nicht zu, muss der Test wiederholt werden.

Gute Labor Praxis verlangt die Erhebung der folgenden Kit-spezifischen Daten: Lot Nummer des Kits, Datum der Rekonstitution einzelner Reagenzien, Konzentrationen des Kalibrators und der Kontrollen, Konzentration eines internen Serum-Pools.

EINSCHRÄNKUNG DER LEISTUNGSMERKMALE

- Aufgrund von Interferenzen bei der photometrischen Bestimmung müssen lipämische Seren entweder durch Ultrazentrifugation oder mittels LipoClear von StatSpin Inc. (www.statspin.com) vorbehandelt werden. Ikterische oder hämolytische Seren können nicht verwendet werden.

- Die Ergebnisse sollten in Verbindung mit der Anamnese des Patienten und weiteren diagnostischen Tests verwendet werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay Präzision: 2.7%. Die Präzision wurde bestimmt durch die 20-fache Einzelmessung von drei unterschiedlichen Serumproben im gleichen Ansatz (Table 12).

Inter-Assay Präzision: 8.1%. Die Präzision wurde bestimmt durch die Messung von drei unterschiedlichen Serumproben in zwanzig Ansätzen (Table 13).

Verdünnungslinearität: 108.9%. 14 Serumproben mit erhöhter ACE Aktivität (Bereich: 100-172 U/l) wurden mit physiologischer NaCl Lösung von 1:1 bis zu 1:32 verdünnt und in verschiedenen Ansätzen getestet. Insgesamt wurden 140 Resultate ausgewertet. Der Median der Verdünnungslinearität (beobachtet gegen erwartet) beträgt 108.9% wobei die 5-95. Percentile 90 bis 137% beträgt (siehe Table 14 and Figure 1). Die kinetische Methode ist bis mind. 150 U/l linear.

Wiederfindung: 99.8%. Zwei verschiedene Serumproben wurden mit ansteigender Menge ACE versetzt und danach entsprechend der Arbeitsanleitung analysiert (Table 15).

Nachweisgrenze (LoB): <5 U/l. Die analytische Sensitivität ist abhängig von der Präzision des verwendeten Klinisch-Chemischen Analysegerätes. Die Meßgenauigkeit des Analysegerätes wurde durch die mehrmalige Messungen mit Wasser (Blank Reagenz) durchgeführt und der berechnete Mittelwert +3 Standardabweichungen in ACE U/l konvertiert.

Für den Cobas Mira wurde eine Instrumenten Nachweisgrenze von 2.5 U/l ($n=100$) und für den Kone T30 Analyzer von 3.6 U/l ($n=33$) berechnet.

Nachweisgrenze (LoQ): ~12 U/l. Die funktionelle Sensitivität wurde durch Mehrfachmessung ($n=365$) von verschiedenen Seren ($n=45$) mit mittlerer bis tiefer Aktivität (Bereich: 1.5 – 35.5 U/l). Die ACE Aktivität bei welcher ein CV von 20% erreicht wird liegt bei 12 U/l.

Spezifität: Inhibition durch das natürliche Substrat Ang I sowie durch EDTA und H-Val-Trp-OH. Eine Serumprobe mit definierter ACE Aktivität wurde inhibiert und danach gemessen (Table 16).

REFERENZINTERVALLE

Die Serum ACE Aktivität ist stark abhängig vom Genotyp der untersuchten Patienten (5). Aus diesem Grunde sind die ermittelten Referenzwerte abhängig vom genetischen Muster der untersuchten Spender und Unterschiede können durch die Häufigkeit der drei Genotypen in der untersuchten Spendergruppe erklärt werden.

Mittels einer Gruppe von **80 erwachsenen Normalblutspendern** aus der Schweiz, wurde ein Referenzbereich (2.5-97.5 Percentile) bestimmt (siehe Table 17):

20 – 70 U/l

In einer Studie mit 159 Freiwilligen (Kaukasier), welche in einer medizinischen Überprüfung als gesund eingestuft wurden, wurde die Serum ACE Aktivität gemessen. Es konnte keine Korrelation zwischen der ACE Aktivität und dem Alter der Probanden gefunden werden. Es wurde ein Medianwert von 45.1 U/l und ein Normalbereich (2.5-97.5 Percentile) von 16 – 85 U/l beschrieben (5)

In einer Studie wurden Serum Proben von 50 Sarcoidosis Patienten bestimmt und lagen im Bereich von 45 – 135 U/l (6).

Serum ACE Werte von Personen unter 18 Jahren sind bedeutend höher und zeigen eine höhere Schwankungsbreite als bei Erwachsenen (5). Elmlinger et al. untersuchten **84 Kindern** im Alter von 6 Monaten bis 18 Jahren. Dabei wurde ein Normalbereich im Serum (2.5-97.5 Percentile) bestimmt von (siehe Table 17):

29 – 112 U/l

Es wurden keine Unterschiede in Bezug auf das Geschlecht oder verschiedene Alterskategorien festgestellt. Neugeborene (0-6 Monate) dagegen zeigen sehr tiefe ACE Aktivitäten (Daten werden nicht gezeigt).

METHODEN VERGLEICH

80 Seren von Normalblutspendern (siehe oben) wurden mit den drei unterschiedlichen Tests von Bühlmann AG getestet. Die Resultate vom ACE kinetik Test, ACE colorimetric und vom radioenzymatischen ACE direct Test wurden miteinander verglichen:

ACE kinetik = 1.065 * ACE colorimetric – 6.05 U/l;
r = 0.94; R² = 0.88

ACE kinetik = 1.368 * ACE direct – 13.96 U/l;
r = 0.94; R² = 0.89

FRANCAIS

DOMAINE D'UTILISATION

La trousse de dosage BÜHLMANN ACE kinetic est conçue pour la détermination diagnostique *in vitro* quantitative directe de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) dans le sérum.

PRINCIPE DU DOSAGE

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) catalyse la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. Cet enzyme est également le médiateur du clivage d'un substrat synthétique (FAPGG) en dérivés d'acides aminés et en un dipeptide. La cinétique de ce clivage est mesurée en observant la diminution de l'absorbance à 340 nm (1,2). La méthode cinétique de dosage de l'ACE des LABORATOIRES BÜHLMANN est standardisée par rapport à la méthode colorimétrique (Trousse ACE colorimetric des LABORATOIRES BÜHLMANN et est conforme aux méthodes de références décrites en 3 et en 4.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité			Code	Reconstitution
	KK-ACK/ KK-ACK4	KK-ACK2	KK-ACKX		
Substrats	1 flacon/ 4 flacons 26 ml	2 flacons 13 ml	3 flacons 100 ml	B-ACK-SUB B-ACK2-SUB ¹ B-ACKX-SUB ²	Prêt à l'emploi
Calibrateurs ³	1 flacon/ 2 flacons	2 flacons	3 flacons	B-ACK-CA	A reconstituer avec 2 ml d'eau stérile
Contrôle ⁴ Normal et Elevé	1x2 fl./ 2x2 fl	2x2 fl.	3x2 fl.	B-ACK- CONSET	A reconstituer avec 2 ml d'eau stérile

Table 5

¹ Codes de commande pour KK-ACK2 entre parenthèses.

² Codes de commande pour KK-ACKX entre parenthèses.

³ Calibrateur ACE lyophilisé dans une matrice sérique, a une activité spécifique à chaque lot. Après reconstitution, laisser reposer 15 minutes à 18-28°C puis bien mélanger avant d'utiliser. Le Calibrateur a été standardisé par rapport à la méthode colorimétrique : Trousse BÜHLMANN ACE colorimetric.

⁴ Les Contrôles ACE Normal et Elevé sont lyophilisés dans une matrice sérique. Ils ont une activité spécifique à chaque lot. Après reconstitution, laisser reposer 15 minutes à 18-28°C puis bien homogénéiser avant d'utiliser.

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non reconstitués	
Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette	
Réactifs reconstitués	
Substrat	Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette
Calibrateur	Stable durant 6 mois à 2-8°C
Contrôles	

Table 6

PRECAUTIONS

PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

- Les calibrateurs et contrôles contiennent des composants d'origine humaine. Bien que les tests de détection de l'antigène de surface du VHB et des anticorps des virus VHC et VIH1/2 se soient révélés négatifs, il convient de considérer les réactifs comme capables de transmettre des maladies infectieuses, et de les manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, en prenant les précautions appropriées.

- Les solutions et réactifs non utilisés doivent être éliminés conformément à la réglementation locale

PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Le test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte ou de modification des réactifs, ou de stockage dans des conditions autres que celles détaillées dans le présent mode d'emploi.
- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Laisser les réactifs équilibrer à la température ambiante. Reconstituer les réactifs lyophilisés comme indiqué. Bien mélanger (au vortex) les réactifs avant utilisation.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision de 25, 100, 150 et 250 µL avec pointes jetables
- Tubes en verre et centrifugeuse de laboratoire pour le prétraitement des échantillons lipémiques avec le LIPEX
- Tubes à essai en plastique pour l'incubation des échantillons et du Calibrateur
- Vortex
- Bain-marie ou incubateur à 37°C
- Spectrophotomètre avec cuvettes thermo-contrôlées pour l'incubation à 37°C et la mesure de l'absorbance à 340 nm.
- Analyseur de chimie clinique avec filtres 340 nm (en option)

PRELEVEMENT, PREPARATION ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Comme l'EDTA inhibe l'activité de l'ACE, seuls les échantillons de sérum devront être testés:

- Recueillir une quantité suffisante de sang (au minimum 0.5 mL) par ponction veineuse au moyen d'une seringue en plastique ou d'un tube pour ponction veineuse ne contenant pas d'anticoagulant.
- Laisser sédimenter pendant 2-3 heures à température ambiante puis centrifuger à 4°C et recueillir le sérum.
- Congeler l'échantillon de sérum à -20°C si le dosage n'est pas effectué dans les 5 jours. L'activité de l'ACE est stable dans le sérum stérile durant 30 jours à 2-8°C et durant 6 mois à -20°C.

Afin d'éviter les sérums lipémiques, il est conseillé de prélever les échantillons sanguins chez des patients à jeun.

PROCEDURE

Protocol pour le dosage (La procédure d'automatisation est décrite ci-dessous)

Le substrat doit être à température ambiante. Eviter de chauffer le substrat. Pré-traiter tous les échantillons lipémiques comme décrit précédemment.

1. Identifier deux tubes en plastique pour chaque calibrateur, chaque contrôle et chaque échantillon.
2. Pipeter 25 µL de Calibrateur, de contrôle et d'échantillon dans les tubes correspondants.

REMARQUE: Pour chaque tube, suivre individuellement la procédure ci-dessous (en fonction de la capacité du photomètre utilisé) :

3. Ajouter 250 µL de substrat à chaque tube et vortexer consciencieusement.
4. Incuber durant 5 minutes à 37°C au bain-marie.
5. Calibrer le photomètre à zéro absorbance avec de l'eau distillée.

6. Transférer l'échantillon dans une micro-cuvette et mesurer l'absorbance à 37°C et 340 nm deux fois dans un intervalle de temps exactement égal à 10 minutes.

STANDARDISATION

La cinétique ACE (KK-ACK) est standardisée par rapport à la méthode de référence établie par Lieberman (3). Les valeurs obtenues avec cet essai sont identiques à celles obtenues avec l'essai ACE colorimétrique de BÜHLMANN.

APPLICATION AUX ANALYSEURS DE CHIMIE CLINIQUE

Automation sur les analyseurs de chimie clinique

Le dosage cinétique de l'ACE peut être effectué au moyen d'un analyseur de chimie clinique ouvert. Bühlmann vous assistera dans le réglage des appareils. Afin de garantir une équivalence des caractéristiques cinétiques entre les versions manuelle et automatisée, nous recommandons d'utiliser les volumes et/ou ratios établis pour la version manuelle. Consulter le mode d'emploi de l'instrument pour toute question concernant la programmation et l'utilisation de l'analyseur. Nous conseillons aussi que chaque laboratoire devrait évaluer les performances du test sur leur instrument.

DES INSTRUCTIONS POUR LA PROGRAMMATION DES PARAMETRES SUR DIVERS AUTOMATES SONT DISPONIBLES SUR DEMANDE.

CALCUL DES RESULTATS

Calculer l'activité enzymatique (E_x) correspondante pour chaque échantillon inconnu en divisant la différence d'absorbance de l'échantillon individuel (ΔA_x) par la moyenne de la différence d'absorbance du Calibrateur (ΔA_c) et en multipliant le résultat par la valeur de l'activité enzymatique (E_c) indiquée sur la fiche technique (voir Table 11 pour un exemple):

$$E_x = \frac{\Delta A_x}{\Delta A_c} \times E_c$$

Procédure automatisée: Utiliser le mode RATE pour calculer les résultats. Veuillez vous référer au manuel de votre appareil pour de plus amples informations.

Définition: Une unité d'activité de l'ACE (unité ACE) est définie comme étant la quantité d'enzyme requise pour libérer 1 µmol d'acide hippurique par minute et par litre de sérum à 37°C comme défini dans l'essai colorimétrique:

$$1 \text{ unité ACE} = \frac{1 \mu\text{mol acide hippurique}}{\text{min} \times \text{L}} = 1 \text{ U/L}$$

CONTROLE DE QUALITE

Les valeurs des Contrôles "Normal" et "Elevé" fournis dans la trousse doivent se trouver dans l'intervalle spécifique mentionné sur la feuille de valeurs correspondante. Dans le cas contraire, le dosage doit être répété.

Les bonnes pratiques de laboratoire entendent que les données suivantes soient enregistrées pour chaque essai: N° de lot de la trousse, dates de reconstitution des réactifs utilisés, concentrations du Calibrateur et des contrôles, concentration du pool sérique interne.

LIMITATIONS

- En raison d'interférences avec la mesure photométrique, les sérums lipémiques doivent être prétraités, soit par ultracentrifugation, soit à l'aide de LipoClear (StatSpin, Inc., www.staspin.com). Les sérums ictériques et hémolytiques ne peuvent pas être utilisés pour le dosage de l'ACE.

- Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte des informations résultant de l'examen clinique du patient et d'autres procédures diagnostiques.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Précision intra-essai : 2.7%. La précision intra-assay a été établie en mesurant 3 échantillons sériques différents 20 fois au cours d'un même dosage (voir Table 12).

Précision inter-essai : 8.1%. La précision inter-assay a été définie en mesurant deux échantillons sériques de contrôle au cours de 20 essais différents (voir Table 13).

Linéarité de la dilution : 108.9%. 14 échantillons sériques présentant une activité ACE élevée (domaine de mesure: 100-172 U/l) ont été dilués de 1:1 à 1:32 avec une solution physiologique de NaCl puis dosés plusieurs fois. La valeur de la moyenne de la linéarité de la dilution (observée vs. attendue) est 108.9% et le 5-95^{ème} percentile est 90 à 137% (cf. Table 14 and Figure 1). La méthode cinétique est linéaire jusqu'à au moins 150 U/l.

Test de récupération : 99.8%. Des quantités croissantes d'ACE connues ont été ajoutées à deux échantillons sériques différents, analysés selon la procédure standard (voir Table 15).

Limite de blanc (LoB) : <5 U/l. La sensibilité analytique est dépendante de la précision de l'analyseur de chimie clinique utilisé. Des mesures répétées de l'eau (réactif blanc) ont permis de déterminer l'imprécision de l'analyseur en calculant la valeur de la moyenne +3 SD et de la convertir en U/l.

La limite de détection de l'appareil Cobas Mira est calculée comme étant égale à 2.5 U/l (n=100) et égale à 3.6 U/l (n=33) pour l'analyseur Kone T30.

Limite de quantification (LoQ) : ~12 U/l. La sensibilité fonctionnelle a été déterminée par des mesures répétées (n=356) d'une série de sérums (n=45) présentant une activité moyenne à basse (domaine de mesure: 1.5-35.5 U/l). L'activité ACE à 20 %CV a été définie comme étant égale à 12 U/l.

Spécificité: Inhibition par le substrat naturel (Ang I), par EDTA et par H-Val-Trp-OH. Un échantillon sérique d'activité ACE prédéterminée a été remesuré après inhibition (voir Table 16).

INTERVALES DE REFERENCES

L'activité de l'ACE sérique dépend fortement du génotype du patient (5). Par conséquent, les valeurs de référence dépendent du modèle génétique du donneur et des différences peuvent être expliquées par la fréquence des trois génotypes dans le groupe de donneurs.

Au cours d'une étude basée sur un groupe de **80 donneurs de sang adultes** (20-70 ans) résidant en Suisse, le domaine de référence (2.5-97.5^{ème} percentile) a été définie comme étant (cf. Table 17):

20 – 70 U/l

Dans une étude 159 volontaires d'origine caucasienne, classifiés comme apparemment en bonne santé par un examen médical, ont été testés pour l'activité ACE. Aucune corrélation entre l'activité d'ACE sérique et l'âge n'a pu être mise en évidence. Une valeur médiane de 45.1 U/l et un domaine normal (le 2.5^{ème} 97.5^{ème} percentile) de 16 – 85 U/l ont été définis.

Dans une étude, le taux d'ACE sérique chez les patients atteints de sarcoïdose a été mesuré entre 45 et 135 U/l (6). Les taux sériques normaux d'ACE des individus de moins de 18 ans sont substantiellement plus élevés et plus variables que ceux des adultes (5). Elmlinger et al. (Hôpital

pédiatrique, Tübingen, Germany) ont examiné **84 enfants** de 6 mois à 18 ans. Un domaine de mesure a été défini pour le sérum normal (2.5-97.5^{ème} percentile) comme étant égal à (cf. Table 17):

29 – 112 U/l

Aucune différence n'a été mise en évidence concernant la répartition par âge ou par sexe des enfants. Les nouveau-nés (0 à 6 mois) présentent une activité ACE très basse (Données non montrées).

COMPARAISON DE METHODES

La comparaison de 80 échantillons sériques de donneurs présumés sains (voir ci-dessus) sont analysés avec les trois méthodes de BÜHLMANN. Les résultats de ACE cinétique, la méthode directe radioenzymatique et la méthode colorimétrique permis d'établir les corrélations suivantes:

ACE kinetic = 1.065 * ACE colorimetric – 6.05 U/l;
r = 0.94; R² = 0.88

ACE kinetic = 1.368 * ACE direct – 13.96 U/l;
r = 0.94; R² = 0.89

OBIETTIVI DEL DOSAGGIO

Il test BÜHLMANN è un dosaggio in vitro su siero che misura in modo diretto e quantitativo l'attività dell' Enzima di Conversione dell'Angiotensina (ACE).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

ACE catalizza la reazione di conversione dell'Angiotensina I in Angiotensina II. L'enzima media il clivaggio di un substrato sintetico in un dipeptide e un derivato aminoacidico. Le cinetiche della reazione di clivaggio sono misurate seguendo la riduzione delle assorbanze a 340 nm (1, 2). Il metodo ACE cinetico è standardizzato con il metodo colorimetrico della BÜHLMANN secondo il metodo descritto nei riferimenti letterari 3 e 4 in fondo alla metodica.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità			Codice	Ricostituzione
	KK-ACK/ KK-ACK4	KK- ACK2	KK- ACKX		
Substrato	1 flacone/ 4 flaconi 26 ml	2 flac. 13 ml	3 flac. 100 ml	B-ACK-SUB B-ACK2- SUB ¹ B-ACKX- SUB ²	Pronto all'uso
Calibratore³	1 flacone / 2 flaconi	2 flac.	3 flac.	B-ACK-CA	Aggiungere 2 ml di acqua sterile
Controlli⁴ Normale e alto	1x2 flac. / 2x2 flac.	2x2 flac.	3x2 flac.	B-ACK- CONSET	Aggiungere 2 ml di acqua sterile

Table 7

¹ Codice di acquisto per KK-ACK2.

² Codice di acquisto per KK-ACKX.

³ Calibratore ACE liofilizzato in matrice proteica sierica con attività lotto specifica. Dopo ricostituzione lasciare per 15 minuti a 18-28°C e mescolare bene prima dell'uso. Il calibratore è stato standardizzato con il kit colorimetrico della BÜHLMANN ACE (cf. sopra).

⁴ Controlli ACE Normale e alto liofilizzati in matrice proteica sierica con attività lotto specifica. Dopo ricostituzione lasciare per 15 minuti a 18-28°C e mescolare bene prima dell'uso.

CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti non aperti	
Stabile fino alla scadenza a 2-8°C	
Reagenti aperti/ricostituiti	
Substrato	Stabile fino alla scadenza a 2-8°C
Calibratore	Stabile per 6 mesi a 2-8°C
Controlli	

Table 8

PRECAUZIONI**PRECAUZIONI DI SICUREZZA**

- Il calibratore e i controlli contengono componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all'antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le buone pratiche di laboratorio utilizzando le dovute precauzioni.
- In merito alle precauzioni adeguate per il maneggiamento e lo smaltimento di reagenti del kit consigliamo di consultare prima le normative locali speciali del proprio paese.

PRECAUZIONI TECNICHE

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, modificati o

conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.

- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Ricostituire i reagenti liofilizzati secondo le indicazioni. Miscelare bene (agitare in modo vorticoso) i reagenti prima dell'uso.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione: 25, 100, 150, 250 µl e 2 ml
- Provette di plastica per la incubazione di calibratori e campioni
- Vortex mixer
- Incubatore a bagnomaria a 37°C
- Spettrofotometro con contenitore cuvette a temperatura controllata a 37°C e per misurazioni di assorbanza a 340 nm
- Analizzatore di chimica clinica con filtro a 340 nm (opzionale)

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Poiché l' EDTA inibisce l'attività ACE, il siero è il campione d'elezione per la determinazione dell'attività.

Raccogliere sufficiente campione ematico (almeno 0.5 ml) per mezzo di flebotomia in appropriate provette senza anticoagulante.

Lasciare il sangue coagulare per 2-3 ore a temperatura ambiente e poi centrifugare a 4°C e 1000 x g; raccogliere il siero.

Se non si esegue il dosaggio entro 5 giorni, congelare il siero a -20°C. L'attività ACE in siero sterile è stabile per almeno 30 giorni a 2-8°C e 6 mesi a -20°C.

Per evitare sieri lipemici, il campione ematico dovrebbe essere prelevato a digiuno. A causa dell'interferenza con determinazioni fotometriche i sieri lipemici devono essere pretrattati o con ultracentrifugazione o con LipoClear della StatSpin Inc. (www.statspin.com). Non si possono usare sieri itterici o emolitici per la determinazione dell'attività ACE.

PROCEDURA

Protocollo (per la procedura automatica vedi il capitolo successivo)

Lasciare che il substrato raggiunga la temperatura ambiente. Evitare il riscaldamento del substrato. Pretrattare tutti i sieri lipemici come descritto sopra.

1. Etichettare due provette per ciascun calibratore e siero di controllo. Etichettare provette aggiuntive per ciascun campione.
 2. Pipettare 25 µl di calibratore, controllo o siero di paziente, rispettivamente, nelle provette corrispondenti.
- NOTE: Per ciascun campione seguire la procedura individualmente sottolineata più avanti in base alla capacità del fotometro utilizzato:
3. Aggiungere 250 µl di substrato a ciascun campione e miscelare con vortex.
 4. Incubare 5 minuti a 37°C in bagnomaria.
 5. Tarare (azzerare) il fotometro con acqua distillata.
 6. Trasferire il campione nelle microcuvette e misurare l'assorbanza a 37°C e 340 nm due volte in un intervallo di tempo pari, esattamente, a 10 minuti.

STANDARDIZZAZIONE

L'ACE cinetico (KK-ACK) è standardizzato secondo il metodo di riferimento stabilito da Liebermann. I valori di questo dosaggio sono sovrapponibili con quelli ottenuti con il metodo standard BÜHLMANN offre ACE colorimetrico.

RISULTATI E AUTOMAZIONE

Automazione con analizzatori di chimica clinica

ACE cinetico può essere eseguito anche su analizzatori di chimica clinica aperti. BÜHLMANN offre assistenza per l'adattamento dei settaggi dello strumento. Per garantire caratteristiche cinetiche equivalenti tra metodica manuale e automatizzata, raccomandiamo di usare i volumi e/o i quozienti stabiliti per la versione manuale.

Per istruzioni sulla programmazione e sulle operatività dello strumento si prega di vedere il manuale d'uso dell'analizzatore. Raccomandiamo anche che ogni laboratorio evalua le caratteristiche di prestazione sul proprio strumento.

LA LISTA DEI PARAMETRI DI PARECCHI ANALIZZATORI E' DISPONIBILE SU RICHIESTA.

ELABORAZIONE DEI RISULTATI

Calcolare la corrispondente attività enzimatica (E_x) di ciascun campione sconosciuto dividendo il delta assorbanza di ogni singolo campione (ΔA_x) con la media del delta assorbanza dei calibratori (ΔA_c) e moltiplicando con l'attività enzimatica (E_c) indicato sul foglio dei dati (cf. Table 11):

$$E_x = \frac{\Delta A_x}{\Delta A_c} \times E_c$$

Procedimento automatizzato: Per il calcolo dei risultati utilizzare la modalità "RATE". Per ulteriori dettagli riferire al manuale dello strumento.

Definizione: Un unità di attività ACE è definita come la quantità di enzima richiesta per rilasciare 1 μmol di acido ippurico per minuto e per litro di un siero a 37°C come determinato da dosaggi colorimetrici:

$$1 \text{ unità ACE} = \frac{1 \mu\text{mol acido ippurico}}{\text{min} \times \text{L}} = 1 \text{ U/l}$$

CONTROLLO DI QUALITÀ

I valori dei controlli normale o alto forniti con il kit devono essere nell'ambito di un range lotto specifico indicato nel corrispondente foglio fornito nella scatola. Se ciò non avviene il dosaggio deve essere ripetuto.

E' buona pratica di laboratorio registrare i seguenti dati per ciascun dosaggio : numero di lotto del kit, data di ricostituzione dei componenti usati, valore di concentrazione dei calibratori e controlli, valore di concentrazione del pool di sieri interni.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Precisione Intra-Assay: 2.7%. La precisione intradosaggio è stata determinata attraverso la misurazione di tre differenti campioni sierici 20 volte in un singolo dosaggio (singola seduta). (cf. Table 12).

Precisione Inter-Assay: 8.1%. La precisione interdosaggio è stata determinata attraverso la misurazione di tre differenti sieri di controllo di 20 differenti sedute.(cf. Table 13).

Linearità della diluizione: 108.9%. 14 sieri con attività elevata d'ACE (range: 100-172 U/l) sono stati diluiti 1:1 fino a 1:32 con soluzione fisiologica NaCl in differenti sedute. Totalmente 140 valori sono stati analizzati. Il valore mediano della linearità della diluizione (osservata contro

aspettata) è 108.9% e un 5-95^{imo} percentile va da 90 a 137%(cf. Table 14 and Figure 1). La metodica della cinetica è lineare fino 150 U/l.

Recupero: 99.8%. Quantità crescenti di ACE sono state aggiunte a due differenti campioni analizzati seguendo la procedura (cf. Table 15).

Limite del Bianco (LoB): < 5 ACE U/l. La sensitività analitica dipende dalla precisione dell'analizzatore di chimica clinica usato. Ripetendo i dosaggi con acqua (reagente bianco), l'imprecisione dell'istrumento è stato determinato calcolando il valorio medio + 3SD e convertendo in unità ACE U/l.

Per Cobas Mira il limite della detezione dell'istrumento è 2.5 U/l (n=100) e per l'analizzatore Kone T30 è 3.6 U/l (n=33).

Limite di Quantificazione (LoQ): ~12 ACE U/l. La sensitività funzionale è stata determinata ripetendo i dosaggi (n=356) di differenti sieri (n=45) con attività medie fino a basse (range: 1.5-35.5 U/l).L'attività ACE a 20% di CV è di 12 U/l.

Specificità: Inibizione con il suo substrato naturale Ang I e con EDTA e H-Val-Trp-OH. Un campione sierico con attività ACE definita è stato inibito e dosato nuovamente (cf. Table 16).

INTERVALLI DI RIFERENZA

L'attività ACE del siero dipende fortemente dal genotipo dei pazienti studiati (5). Di conseguenza, i valori di riferimento dipendono dal codice genetico dei donatori e le differenze possono essere spiegate dalla frequenza dei tre genotipi nel gruppo dei donatori studiati.

Da un gruppo di **80 adulti** (età compresa tra 20-70) donatori di sangue Svizzeri, è stato determinato il range (2.5-97.5th Percentile) di normalità che risulta essere (cf. Table 17):

20 – 70 U/l

In uno studio sono stati determinati livelli sierici dell' ACE di 159 volontari caucasoidi, caratterizzati in buona salute dopo un esame medico. Nessuna correlazione è stata rilevata tra attività ACE del siero ed età. Un valore mediano di 45.1 U/l e un range normale da 16 a 85 U/l (2.5^o -97.5^o percentile) sono stati stabiliti (5).

In uno studio, campioni di 50 pazienti con sarcoidosi erano nell'ambito di un range di 45-135 ACE U/l (6).

I livelli sierici di ACE in individui sotto i 18 anni di età sono sostanzialmente più alti a più variabili che negli adulti (5). Elmlinger et al. (Children's Hospital, Tübingen, Germany), esaminati **84 bambini** dall'età di 6 mesi fino a 18 anni. Un range di normalità è stato determinato (2.5-97.5th Percentile) che risulta essere (cf. Table 17):

29 – 112 U/l

Non sono state osservate differenze significative dividendo in categorie di sesso o età. Neonati (0-6 mesi) dimostrano attività ACE molto basse (dati non indicati).

CONFRONTO DEI METODI

In un confronto di 80 sieri di individui apparentemente normali (vedi al sopra) sono stati analizzati sia con metodo cinetico che con il metodo colorimetrico che metodo radioenzimatico. Le rette di correlazione tra i metodi erano le seguenti:

ACE kinetic = 1.065 * ACE colorimetric – 6.05 U/l;
r = 0.94; R² = 0.88

ACE kinetic = 1.368 * ACE direct – 13.96 U/l;
r = 0.94; R² = 0.89

ESPAÑOL

USO ESPECÍFICO

El test BÜHLMANN de cinética ACE ha sido diseñado para la determinación diagnóstica *in vitro*, directa y cuantitativa de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en suero mediante un ensayo enzimático.

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

La ACE cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II. La enzima posibilita también la fragmentación de un sustrato sintético en un aminoácido-derivado y un dipéptido. Las cinéticas de esta reacción de fragmentación se miden siguiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm (1,2). El método cinético ACE se ha estandarizado con el kit colorimétrico ACE de BÜHLMANN según el método descrito en las referencias 3 y 4.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad			Código	Reconstitución
	KK-ACK/ KK-ACK4	KK-ACK2	KK-ACKX		
Substrato	1 vial/ 4 viales 26 ml	2 viales 13 ml	3 viales 100 ml	B-ACK-SUB B-ACK2-SUB ¹ B-ACKX-SUB ²	Listo para usar
Calibrador ³)	1 vial/ 2 viales	2 viales	3 viales	B-ACK-CA	Añadir 2 ml de agua esterilizada
Controles ⁴) Normal y Alto	1x2 viales/ 2x2 viales	2x2 viales	3x2 viales	B-ACK-CONSET	Añadir 2 ml de agua esterilizada

Table 9

¹ Códigos de pedido para KK-ACK2.

² Códigos de pedido para KK-ACKX.

³ Calibrador ACE liofilizado en una matriz de proteína sérica con actividad especificada por lote. Después de la reconstitución, dejar en reposo durante 15 minutos a 18-28°C y mezclar bien antes de usar. El calibrador se ha estandarizado con el kit colorimétrico ACE de BÜHLMANN (conforme arriba indicado).

⁴ Controles ACE Normal y Alto liofilizados en una matriz de proteína sérica con actividad especificada por lote. Después de la reconstitución, dejar en reposo durante 15 minutos a 18-28°C y mezclar bien antes de usar.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos no abiertos	
Estables a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta	
Reactivos abiertos/reconstituidos	
Substrato	Estable hasta la fecha de caducidad a 2-8°C
Calibrador	Estables durante 6 meses a 2-8°C
Controles	

Table 10

PRECAUCIONES

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- El calibrador y los controles de este kit contienen componentes de origen humano. Aunque se ha comprobado y encontrado negativo para el antígeno de superficie de HBV y anticuerpos HCV y VIH1/2, los reactivos deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones y deben manejarse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, tomando las precauciones adecuadas.
- En cuanto a las precauciones adecuadas para la eliminación de los reactivos del kit, recomendamos

encarecidamente consultar con anterioridad la normativa local específica de su país.

PRECAUCIONES TÉCNICAS

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.
- Deje atemperar los reactivos hasta que alcancen la temperatura ambiente. Reconstituir los reactivos liofilizados según las instrucciones. Mezcle bien (con agitador de vórtice) los reactivos antes de su uso.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión: 25, 100, 150, 250 µl y 2 ml
- Tubos de ensayo de plástico para muestras o incubación del patrón
- Mezclador vortex
- Baño de agua para series de incubación a 37°C
- Espectrofotómetro con porta-cubetas de temperatura controlada para incubación a 37°C y con medida de absorbancia a 340 nm
- Analizador Químico-clínico con filtro de 340 nm (opcional)

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Dado que el AEDT (ácido etilendiaminotetraacético) inhibe la actividad de la ACE, para la determinación de la actividad de la ACE deben ser usadas muestras de suero:

- Recoger por venipunción sangre suficiente (por lo menos 0.5 ml) en un tubo adecuado sin anticoagulante.
- Dejar la sangre en reposo a temperatura ambiente durante 2-3 horas, y después centrifugar a 4°C y 1000 x g; recoger el suero.
- Congelar la muestra de suero a -20°C si no va a ser analizada en el transcurso de los 5 días siguientes. La actividad de la ACE en suero esterilizado es estable durante más de 30 días a 2-8°C y durante 6 meses a -20°C.

Para evitar sueros lipémicos, la muestra de sangre se debe tomar con el paciente en ayunas.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Protocolo del ensayo (Para procedimiento automático consulte el siguiente capítulo)

Dejar que el sustrato vuelva a temperatura ambiente. Evitar el calentamiento del sustrato. Pretratar todos los sueros lipémicos según el procedimiento descrito anteriormente.

- Etiquetar dos tubos de plástico para el patrón y el suero de control. Etiquetar tubos adicionales para las muestras de los pacientes
- Pipetar 25 µl de patrón, suero de Control y Muestra del paciente, respectivamente, en los tubos correspondientes.

NOTA: Seguir para cada muestra individualmente el procedimiento que se explica a continuación (de acuerdo con la capacidad del espectrofotómetro usado):

- Añadir a cada muestra 250 µl de sustrato y mezclar completamente.
- Incubar durante 5 minutos a 37°C en baño de agua.
- Poner el espectrofotómetro en absorbancia cero utilizando para ello agua destilada.

- Transferir la muestra a una microcubeta y medir la absorbancia a 340 nm y 37°C dos veces en un intervalo de tiempo de exactamente 10 minutos.

RESULTADOS Y AUTOMATIZACIÓN

Estandarización

La prueba ACE cinético (KK-ACK) se estandariza contra el método de referencia establecido por Lieberman (3). Los valores de este ensayo son idénticos a los valores obtenidos con el ensayo colorimétrico, estándar ACE de BÜHLMANN.

Automatización con Analizadores Químicos

El estudio cinético de la ACE puede llevarse a cabo en cualquier analizador químico abierto. Bühlmann le asistirá para adaptar sus ajustes del instrumento. Para garantizar características cinéticas equivalentes entre la versión manual y automatizada recomendamos de usar de los volúmenes y/o de los cocientes establecidos para la versión manual. Para instrucciones de programación y operación, por favor consulte el "Manual del Operador" del equipo. También recomendamos cada laboratorio de evaluar el funcionamiento del análisis en su instrumento. LISTADOS DE PARÁMETROS PARA VARIOS ANALIZADORES QUÍMICOS SE ENCUENTRAN DISPONIBLES A PETICIÓN.

CÁLCULOS

Calcule la correspondiente actividad enzimática de cada muestra desconocida (E_x) dividiendo la diferencia de absorbancia de la muestra individual (ΔA_x) entre la media de la diferencia de absorbancia del vial patrón (ΔA_c) y multiplicando por la actividad enzimática (E_c) indicada para la hoja de datos (ver ejemplo en la Table 11):

$$E_x = \frac{\Delta A_x}{\Delta A_c} \times E_c$$

Procedimiento automatizado: Para el cálculo de resultados utilice el modo "Rate". Refiera al manual del instrumento para otros detalles.

Definición: Una unidad de actividad ACE se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de Ácido Hipúrico por minuto y por litro de suero a 37°C, según se ha determinado en el ensayo colorimétrico:

$$1 \text{ unidad ACE} = \frac{1 \mu\text{mol Ácido Hipúrico}}{\text{min} \times \text{L}} = 1 \text{ U/l}$$

CONTROL DE CALIDAD

Los valores obtenidos de los Controles Normal y Alto proporcionados con el kit deben estar dentro del rango específico del lote, indicado en el correspondiente folleto de datos. En caso de no ser así el ensayo debe ser repetido.

Constituye un buen procedimiento de laboratorio el registro para cada ensayo de los siguientes datos: número de lote del kit, fechas de reconstitución de los componentes del kit usado, valor de la concentración de patrón y de controles, valores de las concentraciones de la reserva de suero interna.

LIMITACIONES

- Debido a interferencias con la determinación fotométrica, los sueros lipémicos deben ser pretratados bien en Ultracentrífuga o bien en LipoClear de StatSpin Inc. (www.statspin.com). Para la determinación de la actividad de la ACE no se pueden usar sueros ictericos ni hemolíticos.

- Los resultados del ensayo deben interpretarse considerando la información disponible de estudios epidemiológicos, la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Precisión Intra-Ensayo: 2.7%. La precisión intra-ensayo se ha determinado midiendo tres muestras diferentes de suero 20 veces por el procedimiento de test simple (ver Table 12).

Precisión Inter-Ensayo: 8.1%. La precisión inter-ensayo se ha determinado midiendo tres muestras de suero de control de 20 pruebas diferentes (ver Table 13).

Linealidad de Dilución: 108.9%. 14 muestras de suero con actividad elevada del ACE (gama: 100-172 U/l) se han diluido con una solución fisiológica de NaCl a partir de 1:1 hasta 1:32 en varios funcionamientos. En el total 140 valores se han analizado.

El valor mediano de las linealidades de dilución (observado contra esperado) es 108.9% y el percentil 5-95% se extiende de 90 a 137%.

Recuperación respecto a la Adición (Spiking): 99.8%. Se han adicionado cantidades crecientes de ACE a dos muestras diferentes de suero y se han analizado según el procedimiento del ensayo (ver Table 15).

Límite para el blanco (LoB): <5 U/l. La sensibilidad analítica es dependiente en la precisión del analizador usado. La imprecisión del analizador fue determinada por medidas repetidas con agua (reactivo blanco) y calculando el valor medio de +3 SD que fue convertido al ACE U/l.

Los límites de detección eran calculados de ser 2.5 U/l (n=100) para el analizador COBAS Mira y 3.6 U/l (n=33) y para el Kone T30.

Límite de cuantificación (LoQ): ~12 U/l. La sensibilidad funcional fue determinada por medidas repetidas (n=356) en una serie de sueros (n=45) con actividad media a baja (gama: 1.5-35.5 U/l). La actividad de ACE en 20 %CV fue determinada de ser 12 U/l.

Especificidad: Inhibición por su sustrato natural Ang I y por AEDT y H-Val-Trp-OH. Una muestra de suero de actividad ACE definida se ha inhibido y medido nuevamente (Table 16).

INTERVALOS DE REFERENCIA

La actividad de ECA en suero depende considerablemente del genotipo de los objetos de ensayo (5). Por lo tanto, los niveles de referencia están influidos de la frecuencia de los tres genotipos presente en un grupo de donantes de sangre.

El nivel de referencia en suero, determinado en un grupo de **80 adultos** (Suizos a la edad de 20 a 70 años) está (cf. Table 17):

20 – 70 U/l

En un estudio, la actividad de ECA estaba determinada en 159 - según un examen médico - aparentemente sanos caucásicos. No había ninguna correlación entre la actividad de ECA y la edad de los objetos de ensayo. La mediana estaba 45.1 U/l y el nivel de referencia (Percentil 2.5%-97.5%) 16 - 85 U/l (5).

En un estudio en que el suero de 50 pacientes sufriendo de sarcoidosis el nivel de ECA estaba entre 45 y 135 U/l. Los niveles de ECA en suero de individuos menores de 18 años de edad son considerablemente más altos y más variables que en adultos. Elmlinger et al. (Children's Hospital, Tübingen, Germany) investigaron **84 niños** entre

6 meses y 18 años. El nivel de referencia en suero (percentil 2.5-97.5%) estaba (cf. Table 17):

29 – 112 U/l

No hay diferencias significativas entre ambos sexos y no hay una dependencia del ECA de la edad de los objetos de ensayo. La actividad de ECA en recién nacidos está muy baja (datos no demostrados).

COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS

Se compararon 80 sueros de donantes de suero aparentemente sanos (vea arriba), usando el ensayo

cinético ACE con el kit colorimétrico ACE y el kit directo radioenzimático ACE. Los subsiguientes análisis de regresión lineal resultaron en los siguientes datos estadísticos:

ECA cinético = $1.065 * \text{ECA colorimétrico} - 6.05 \text{ U/l}$;
 $r = 0.94$; $R^2 = 0.88$

ECA cinético = $1.368 * \text{ECA directo} - 13.96 \text{ U/l}$;
 $r = 0.94$; $R^2 = 0.89$

Table 11 Example of results

Sample	Abs. t=0min	Abs. t=10min	ΔAbs. t=10min	ACE U/l
Calibrator	1.4737	1.3805	0.093	82.1
Normal Contr	1.5083	1.4663	0.042	37.1
High Control	1.5499	1.4689	0.081	71.6
Unknown	1.4884	1.4174	0.071	62.7

$$E_x = \frac{0.071}{0.093} \times 82.1 = 62.7 \text{ ACE U/l}$$

Table 12 Intra-assay precision

Mean [ACE U/l]	SD [ACE U/l]	n	CV [%]
38.6	1.3	20	3.4
63.6	1.7	20	2.7
85.3	1.8	20	2.1
Mean			2.7

Table 13 Inter-assay precision

Mean [ACE U/l]	SD [ACE U/l]	n	CV [%]
20.2	2.6	20	12.8
48.5	3.6	20	7.4
78.1	3.1	20	4.0
Mean			8.1

Table 14 Dilution linearity (observed/expected)

n	140
mean	110.7 %
95% CI	108.0 – 113.5 %
SD	16.4 %
Median	108.9 %
96.5% CI	105.7 – 111.7 %
IQR	17.7 %

Figure 1 Dilution Linearity

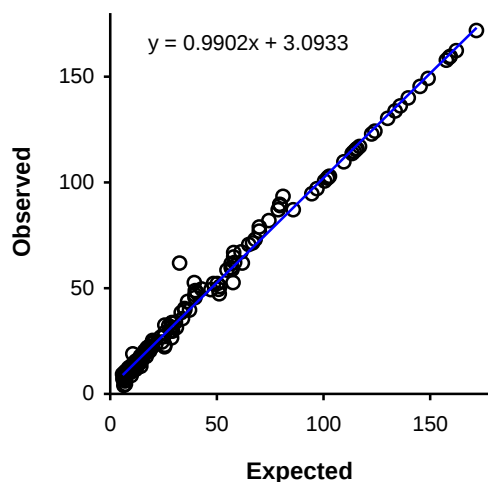


Table 15 Spiking recovery

	Basic value	Spiked with	Calculated	Observed	Recovery[%]
Sample 1	18.5	12.5	31.0	29.8	96
		25	43.5	46.1	106
		50	68.5	70.4	102
Sample 2	29.5	12.5	42.5	40.8	96
		25	54.8	53.1	97
		50	79.8	81.3	102
Mean recovery					99.8

Table 16 Specificity

	Initial ACE value [U/l]	Conc. of inhibitor [M]	Inhibited ACE value [U/l]	Inhibition [%]
Angiotensin 1	49.0	1×10^{-5}	46.5	5.1
		1×10^{-4}	32.5	33.7
		1×10^{-3}	6.5	86.7
EDTA	49.0	3.9×10^{-5}	46.9	4.3
		3.9×10^{-4}	20.3	58.6
		3.9×10^{-3}	ND	100.0
H-Val-Trp-OH * 2 H ₂ O	49.0	1.3×10^{-6}	46.1	5.9
		1.3×10^{-5}	36.2	26.1
		1.3×10^{-4}	10.3	79.0
		1.3×10^{-3}	3.6	92.7

Table 17 Normal values

	Adults Data Bühlmann AG	Adults Biller et al. 2006 (5)	Children Elmlinger et al.
n	80	159	84
Age (years)	20-70	18 - 64	0.5-18
Mean (U/l)	42.2	47.0	70.3
SD (U/l)	14.5	17.3	21.5
Mean ± 2SD	13.2 – 71.2	12.4 – 81.6	27.3 – 113.3
Median (U/l)	40.7	45.1	66.9
IQR (U/l)	21.5	22.5	32.0
2.5-97.5 th Percentile (U/l)	19.8 – 70.2	16.1 – 85.3	29.3 – 112.2

Table description: cf. “Calculation” (page 2) and corresponding “Performance Characteristics” (page 3)

Tabellenbeschreibung: siehe “Berechnung der Resultate” (Seite 4) und “Leistungsmerkmale” (Seite 5)

Explications relatives aux tableaux: voir “Calcul des Résultats” (page 6) et “Caractéristiques de Performance” (page 8)

Descrizione tavola: cf. “Elaborationen dei Risultati” (pagina 8) e “Caratteristiche di Prestazione” (pagina 10).

Explicaciones relativas a las Tablas: ver “Cálculos” (página 9) y “Características de Eficiencia” (página 12)

REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ RÉFÉRENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

1. Ronca-Testoni S.: *Direct spectrophotometric assay for angiotensin-converting enzyme in serum*. Clin Chem **29**, 1093-1096 (1983).
2. Bénéteau B. and Baudin B. et al.: *Automated kinetic assay of angiotensin-converting enzyme in serum*. Clin Chem **32**, 884-886 (1986).
3. Lieberman J.: *Elevation of serum angiotensin converting enzyme (ACE) level in Sarcoidosis*. Am J Med **59**, 36-72 (1975).
4. Hurst P.L. and Lovell-Smith C.J.: *Optimized assay for serum angiotensin converting enzyme activity*. Clin Chem **27**, 2048-2052 (1981).
5. Biller H, Zissel G, Müller-Quernheim J et al.: *Genotype-corrected reference values for serum angiotensin-converting enzyme*. Eur Respir J **28**, 1085-90 (2006).
6. Studdy P.R. and Bird R.: *Serum angiotensin converting enzyme in sarcoidosis – its value in present clinical practice*. Ann Clin Biochem **26**, 13-18 (1990).
7. Bénéteau-Burnat B. and Baudin B. et al: *Serum angiotensin converting enzyme in healthy and sarcoidotic children: comparison with the reference interval for adults*. Clin Chem **36**, 344-346 (1990).

SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Límites de temperatura
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso

Symbol	Explanation
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für „n“ Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
Control N	Normal Control Normalkontrolle Contrôle Normal Controllo normale Control Normal
Control H	High Control Kontrolle hoch Contrôle Elevé Controllo alto Control Alto
CAL	Calibrator Kalibrator Calibrateur Calibratore Calibrador
SUBS	Substrate Substrat Substrat Substrato Substrato

