



# ACE high sensitive

## Angiotensin Converting Enzyme in Cerebrospinal Fluid (CSF)

KK-ACF

Revision date: 2012-11-26

We would like to thank Dr. Jocelyne Draï, CHU Lyon Sud, France for her important work with the optimization of substrate and buffer system in order to improve the sensitivity of the assay. These changes allow the reliable measurement of ACE activity in cerebrospinal fluid.

## ENGLISH

### INTENDED USE

The BÜHLMANN ACE high sensitive test (KK-ACF) is intended for the direct and quantitative determination of angiotensin converting enzyme (ACE) activity in cerebrospinal fluid (CSF) and in diluted serum samples 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.

### REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagent	Quantity	Code	Reconstitution
Substrate	1 vial 11 ml	B-ACF-SUB	Ready to use
Calibrator <sup>1</sup>	1 vial lyophilized	B-ACF-CA	Add 2 ml of deionized water
Controls <sup>2</sup> Low and high	2x 1 vial lyophilized	B-ACF- CONSET	Add 2 ml of deionized water

Table 1

<sup>1</sup> Lyophilized ACE Calibrator in a protein buffer matrix with lot specific activity. After reconstitution leave for 15 minutes at 18-28°C and mix well before use.

<sup>2</sup> Lyophilized ACE low and high Controls in a protein buffer 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

### SAFETY PRECAUTIONS

- The 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

Collect at least 250 µl CSF by lumbar puncture and store it at 2-8°C for up to 24 h or at -20°C for longer 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.

### MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes: 100 µl, 1000 µl
- Sterile physiological NaCl solution (0.9%) for Calibrator and serum sample dilution
- Microtiter plate  
e.g. Maxisorp F8, NUNC Corp. (hand method)
- Microtiter plate reader with kinetic function; 37°C incubation chamber (hand method)
- Manual application: If you use a plate reader without incubator, an external 37°C microtiter plate incubator is needed e.g. Eppendorf Thermomixer comfort.
- Automated application: Clinical chemistry analyzers with incubation time option of 15 min and sample volume option of ~80 µl.

### ASSAY PROCEDURE

#### Hand Method

Make sure that the chamber of your Microtiter plate reader can be adjusted to 37°C – kinetic reader. Program the reader for a 30 min kinetic measurement at 340 nm; measuring points at every minute.

Allow the reagents and samples to equilibrate to 18-28°C prior to use.

#### CSF sample have to be used undiluted

1. Prepare a 1:5 dilution of the Calibrator with 0.9% NaCl solution (e.g. 60 µl Calibrator and 240 µl NaCl solution).
2. **Optional:** If testing serum samples in this assay prepare 1:5 dilutions of the serum samples with 0.9% NaCl solution (e.g. 60 µl serum and 240 µl NaCl solution).

**In order to avoid temperature effects within the microplate leave the first and last strip of the test and the first and last well each strip empty.**

We recommend carrying out the test **in duplicates**.

3. Pipet 80 µl Calibrator (undiluted) in duplicates into wells B2 and B3.

4. Pipet 80 µl Calibrator (1:5 diluted) in duplicates into wells C2 and C3.
5. Pipet 80 µl Control low and high in duplicates into wells D2, D3 and E2, E3, respectively.
6. Pipet 80 µl CSF samples (and/or diluted serum samples) in duplicates into the following wells.
7. Pipet 50 µl Substrate to each reaction well.
8. Shake the plate gently and start reading at 340 nm for 30 min.

**Note: Maintaining a lag time of around 3 minutes is important. Thus disregard the measuring points 1-3 for calculation (pre-incubation time).**

#### DATA REDUCTION

Calculate the slope ( $V_{max}$  = milli units/min) of the Calibrators, Controls and samples from time 180 s to 1800 s. Create a calibration curve with the two calibrators and calculate the results of controls and samples.

**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:

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

Refer to Table 16 and Figure 1 for typical data. *These results and standard curve are provided for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

#### APPLICATION ON CLINICAL CHEMISTRY ANALYZERS

The test can be automated on any clinical chemistry analyzer allowing an incubation time of >15 min and a sample volume of 80 µl.

#### General instrument settings

Test type	photometric
Result unit	U/l (ACE units per liter)
Sample type	CSF
Calibration type	linear
Curve direction	descending
Calibration	duplicates
Substrate (R1)	80 µl
Incubation	90 sec
Sample	80 µl
Incubation	120 sec
Measurement	kinetic
Wavelength	340 nm
Measuring Time	900 sec

#### QUALITY CONTROL

The values of the internal low 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 pool sample.

#### 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.

#### STANDARDIZATION

The BÜHLMANN ACE high sensitive assay standardization is based on the BÜHLMANN ACE kinetic assay (KK-ACK).

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance data has been established with the hand method on microtiter plates.

#### Detection Limits

**Limit of Blank (LoB): 0.3 ACE U/L.** The LoB has been established in two independent runs with a total of 84 blank values with 0.9% NaCl-solution. The LoB is calculated as mean + 2SD.

**Limit of Detection (LoD): 1.0 ACE U/L.** The LoD has been established with four independent CSF samples spiked with ACE at concentrations between 0.5 and 1.5 U/L. Spiked samples were measured in the same run 20 times. The LoD has been calculated in accordance with CLSI protocol EP17-A.

**Limit of Quantification (LoQ): <1.5 ACE U/L.** The LoQ has been established with NaCl-solution spiked with ACE at concentrations between 0.5 and 3.0 U/L. Spiked samples were tested 10 times in two independent runs, each. A limit of 20% CV was applied.

**Linearity: 1.0-24 ACE U/L.** Serial dilution of two independent samples showed linearity within the indicated range (cf. Figure 2).

**Recovery: 97-119%.** Four independent CSF samples were spiked with increasing concentration of ACE and measured according to the assay procedure. Good recovery was found within the linear range of the assay (cf. Table 17).

**Precision: Repeatability: <11% CV; Total precision <20% CV.** CSF samples and NaCl-solution each spiked with ACE where tested over a period of 10 days. Each sample was run in duplicate and independently tested twice per day (cf. Table 18)

#### REFERENCE INTERVALS

178 CSF/serum pairs from non-neurosarcoidotic patients were tested with the ACE high sensitive assay. The calculated mean value is 0.3 U/L, the 95<sup>th</sup> percentile is at 1.3 U/l and the maximum value measured is 1.9 U/L (cf. Table 19).

Based on these normal data BÜHLMANN propose a **cut-off at 2 ACE U/L**. Values >2 ACE U/L should be regarded as elevated and potentially pathologic.

A differential diagnosis of neurosarcoidosis based on elevated ACE activity in CSF is not possible. Further investigations to exclude possible infectious diseases or other granulomatous abnormalities are needed.

**METHOD COMPARISON**

CSF and Serum samples from the normal value study were used for correlation between application and methods. Using the ACE high sensitive assay as the reference method, the following correlations were found:

Correlation	n	R <sup>2</sup>	Bias	Slope
ACF vs. ACF Konelab	132	0.97	-0.11	1.284
ACF vs. ACF Cobas Mira	110	0.95	-0.35	1.058
ACF vs. ACD*	59	0.96	1.43	0.888
ACF vs. ACK	86	0.91	1.176	0.921

Table 3

\* cf. Figure 3

ACF: ACE high sensitive hand method  
 ACF Konelab: ACE high sensitive application on KoneLab T30  
 ACF Cobas Mira: ACE high sensitive application on Cobas Mira  
 ACD: ACE direct (RK-ACD) sensitive radio-enzymatic assay  
 ACK: ACE kinetic (KK-ACK) reference method for serum samples.

**ANWENDUNGSZWECK**

Der BÜHLMANN ACE kinetic Test ist zur direkten und quantitativen diagnostischen Bestimmung der Angiotensin-Converting Enzym (ACE) Aktivität in Liquor (CSF) und verdünnten Serumproben mittels enzymatischer Nachweismethode konzipiert worden.

**PRINZIP DER METHODE**

ACE katalysiert die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II. Das Enzym katalysiert auch die Spaltung des synthetischen Substrats FAPGG in ein Aminosäurederivat und ein Dipeptid. Die Kinetik dieser Abspaltung wird durch die Messung der Abnahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm erfasst.

**GELIEFERTE REAGENZIIEN UND VORBEREITUNG**

Reagenz	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
<b>Substrat</b>	1 Fläschchen 11 ml	B-ACF-SUB	Gebrauchsfertig
<b>Kalibrator<sup>1</sup></b>	1 Fläschchen lyophilisiert	B-ACF-CA	2 ml steriles H <sub>2</sub> O zugeben
<b>Kontrollen<sup>2</sup></b> Normal und hoch	2x1 Fläschchen lyophilisiert	B-ACF-CONSET	2 ml steriles H <sub>2</sub> O zugeben

Tabelle 4

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> 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 REAGENZIIEN**

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 5

**WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

**VORSICHTSMASSNAHMEN**

**SICHERHEITSMASSNAHMEN**

- Alle Reagenzien 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).

### ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten für 100 µl und 1000 µl
- Sterile, physiologische Kochsalzlösung (0.9%), um den Kalibrator und Serumproben zu verdünnen
- Mikrotiterplatten, z.B. Maxisorb F8, NUNC Corp. (Handmethode)
- Mikrotiterplattenreader mit kinetischer Funktion; Inkubationskammer mit Wahlmöglichkeit für 37°C.
- Manuelle Methode: Wenn der Reader keinen Inkubator mit einer Temperatur von 37°C hat, wird ein Mikrotiterplatteninkubator benötigt; z.B. der Eppendorf Thermomixer comfort
- Automatisierte Abarbeitung: Möglich mit allen klinisch-chemischen Analysengeräten, die 15 Minuten Inkubationszeit und ein Pipettiervolumen von ca. 80 ermöglicht.
- Spektralphotometer 340 nm, Filterphotometer 342 nm oder klinisch-chemischer Analyser mit temperierbarem Küvetten-Halter (37°C Inkubation und Messung)

### UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

- Mindestens 0.25 ml Liquor durch Lumbalpunktion entnehmen und bei 2-8°C für bis zu 24 Stunden lagern und für Lagerung über einen längeren Zeitraum bei -20 °C einfrieren.

Der Zusatz von EDTA bei der Blutentnahme blockiert die ACE-Aktivität, deshalb muss die Bestimmung in Serum durchgeführt werden:

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 für manuelle Durchführung:

Stellen Sie sicher, dass die Inkubationskammer Ihres Readers auf 37°C eingestellt werden kann. Programmieren Sie den Reader für eine kinetische Messung über 30 Minuten bei 340 nm; messen Sie einmal/Minute.

Lassen Sie alle Reagenzien auf 18-28°C äquilibrieren.

#### Liquorproben unverdünnt messen.

1. Stellen Sie eine 1:5 Verdünnung des Kalibrators mit 0.9% Kochsalzlösung her.
2. Wenn Sie Serumproben messen wollen, stellen Sie Verdünnungen von 1:5 in 0.9% NaCl her (z.B. 60 µl Serum und 240 µl NaCl Lösung).

**Um Temperaturgradienten in der Platte zu vermeiden, lassen Sie jeweils den 1. und letzten Streifen jeder Platte sowie das erste und letzte Well jedes Streifens leer.**

Wir empfehlen, in Doppelbestimmung anzusetzen.

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

3. 80 µl unverdünnten Kalibrator in die Wells B2 und B3 pipettieren.
4. 80 µl 1:5 verdünnten Kalibrator in die Wells C2 und C3 pipettieren.
5. 80 µl Kontrolle low und high in die Wells D2 und D3 bzw. E2 und E3 pipettieren.
6. 80 µl Liquorproben und/oder verdünnte Serumproben in die nachfolgenden Wells pipettieren.
7. 50 µl Substrat in die entsprechenden Wells pipettieren.
8. Die Platte vorsichtig schütteln und danach die Messung bei 340 nm starten.

**Beachten Sie: Es ist wichtig eine Lag-Time von 3 Minuten einzuhalten, werfen Sie dazu die ersten 3 Messpunkte für die Berechnung (Vorinkubationszeit).**

### BERECHNUNG DER RESULTATE

Berechnen Sie die Steigung der Geraden ( $V_{max}$  = milli Units/Min) von Kalibratoren, Kontrollen und Proben zwischen 180 und 1800 sec. Erstellen Sie eine Kalibrationskurve mit den zwei Kalibratoren und berechnen Sie die Ergebnisse von Kontrollen und Proben.

**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:

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

Typische Ergebnisse können Sie aus Table 16 und Figure 1 entnehmen. Diese Ergebnisse sollen nur als Beispiel dienen. Bei jedem Ansatz muss eine neue Standardkurve erstellt werden.

### ANWENDUNG AUF KLIN. CHEM. AUTOMAT

Der Test kann auf jedem klinisch-chemischen Automaten abgearbeitet werden, auf dem eine Inkubationszeit von >15 Min. und ein Probenvolumen of 80 µl eingestellt werden kann.

#### Generelle Gerätesettings

Testtyp	Photometrisch
Einheit der Ergebnisse	U/l (ACE Unis pro Liter)
Probentyp	CSF
Kalibrationstyp	linear
Kurvensteigung	fallend
Kalibration	Duplikate
Substrat (R1)	80 µl
Inkubation	90 Sek
Probe	80 µl
Inkubation	120 Sek
Messung	kinetic
Wellenlänge	340 nm
Messzeit	900 Sek.

### QUALITÄTSKONTROLLE

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

Gute Laborpraxis verlangt die Dokumentation der folgenden Kit-spezifischen Daten: Lot Nummer des Kits, Rekonstitutions-Datum der Reagenzien, Konzentrationen

des Kalibrators und der Kontrollen, Konzentration eines internen Serum-Pools.

### STANDARDISIERUNG

Die Standardisierung des BÜHLMANN ACE high sensitive Assay basiert auf dem BÜHLMANN ACE kinetic Assay (KK-ACK).

#### 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

Die Leistungsmerkmale wurden mit der Handmethode auf Mikrotiterplatten evaluiert.

#### Nachweisgrenzen

**Limit of Blank (LoB): 0.3 ACE U/L.** Der LoB wurde ermittelt in zwei unabhängigen Läufen mit insgesamt 84 Blank Werten unter Verwendung von 0.9% NaCl-Lösung. Der LoB wurde ermittelt als Mittelwert + 2SD.

**Limit of Detection (LoD): 1.0 ACE U/L.** Der LoD wurde ermittelt unter Verwendung von 4 unabhängigen CSF Proben, die mit ACE Konzentrationen zwischen 0.5 and 1.5 U/L gespikkt wurden. Die gespikkten Proben wurden in einem Lauf 20x gemessen. Der LoD wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien des CLSI Protokolls EP17-A errechnet.

**Limit of Quantification (LoQ): <1.5 ACE U/L.** Der LoQ wurde ermittelt unter Verwendung von NaCl-Lösung, die mit ACE zwischen 0.5 and 3.0 U/L gespikkt wurde. Die gespikkten Proben wurden jeweils 10x in zwei unabhängigen Läufen getestet. Zur Berechnung wurde ein Grenzwert von 20% CV zugrunde gelegt.

**Linearität: 1.0-24 ACE U/L.** Serielle Verdünnungen zweier unabhängiger Proben waren linear innerhalb des angegebenen Bereiches (siehe Figure 2).

**Recovery: 97-119%.** 4 unabhängige CSF Proben wurden mit steigenden Konzentrationen von ACE gespikkt und gemäss der Arbeitsanleitung bestimmt. Eine gute Wiederfindung konnte innerhalb des linearen Messbereiches erzielt werden (siehe Table 17).

**Präzision: Repeatability: < 11 %CV; Total precision < 20%CV.** CSF Proben und NaCl-Lösung, die jeweils mit ACE gespikkt wurden, wurden über eine Periode von 10 Tagen gemessen. Dazu wurde jede Probe zweimal täglich in Doppelbestimmungen gemessen (siehe Table 18).

### REFERENZINTERVALLE

178 CSF/Serum Paare von Patienten ohne Neurosarkoidose wurden mit dem BÜHLMANN ACE high sensitive Assay getestet. Der errechnete Mittelwert beträgt 0.3 U/L, die 95<sup>th</sup> Perzentile liegt bei 1.3 U/L und der Maximalwert wurde mit 1.9 U/L ermittelt (siehe Table 19).

Gemäss dieser Daten schlägt BÜHLMANN **einen Cut-off von 2 ACE U/L vor.** Werte >2 ACE U/L sollten als erhöht und potentiell pathologisch eingestuft werden.

Eine Differentialdiagnose der Neurosarkoidose basierend auf einer erhöhten ACE Aktivität in CSF ist nicht möglich.

Weitere Abklärungen, um eine potentielle Infektionskrankheit oder granulomatöses Erkrankungen sind erforderlich.

### METHODEN VERGLEICHE

CSF und Serum Proben der Normalwert Studie wurden benutzt, um Korrelationen zwischen Applikationen und Methoden zu erstellen. Unter Verwendung des BÜHLMANN ACE high sensitive Assays als Referenzmethode wurden die folgenden Korrelationen ermittelt:

Korrelation	n	R <sup>2</sup>	Bias	Steigung
ACF vs. ACF KoneLab	132	0.97	-0.11	1.284
ACF vs. ACF Mira	110	0.95	-0.35	1.058
ACF vs. ACD*	59	0.96	1.43	0.888
ACF vs. ACK	86	0.91	1.176	0.921

Table 6

\*siehe Figure 3

ACF: ACE high sensitive Handmethode

ACF KoneLab: ACE high sensitive, Applikation auf dem KoneLab T30

ACF Cobas Mira: ACE high sensitive, Applikation auf Cobas Mira

ACD: ACE direct (RK-ACD, sensitiver Radio-enzymatischer Assay)

ACK: ACE kinetic (KK-ACK, Referenzmethode für Serumproben).

# FRANÇAIS

## DOMAINE D'UTILISATION

Le test ACE haute sensibilité de BÜHLMANN (KK-ACF) est destiné à la mesure directe et quantitative de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, ou ACE pour *Angiotensin Converting Enzyme*, dans le liquide cérébro-spinal, ou LCS, et dans des échantillons dilués de sérum par dosage enzymatique.

## PRINCIPE DU DOSAGE

L'enzyme de conversion de l'angiotensine catalyse la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. Cette enzyme est également le médiateur du clivage d'un substrat synthétique, le FAPGG, en un dérivé d'acide aminé et en un dipeptide. La cinétique de cette réaction de clivage est mesurée en observant la diminution de l'absorbance à 340 nm.

## RÉACTIFS FOURNIS ET PRÉPARATION

Réactif	Quantité	Code	Reconstitution
Substrat	1 flacon 11 mL	B-ACF-SUB	Prêt à l'emploi
Calibrateur	1 flacon lyophilisé	B-ACF-CA	À reconstituer avec 2 mL d'eau déionisée
Contrôles Haut et bas	2x 1 flacon lyophilisés	B-ACF- CONSET	À reconstituer avec 2 mL d'eau déionisée

Table 7

<sup>1</sup> Calibrateur ACE lyophilisé dans une matrice tampon protéinique, dont activité est spécifique à chaque lot. Après reconstitution, laisser reposer 15 minutes à 18-28 °C puis bien mélanger avant utilisation.

<sup>2</sup> Contrôles ACE haut et bas lyophilisés dans une matrice tampon protéinique, dont activité est spécifique à chaque lot. Après reconstitution, laisser reposer 15 minutes à 18-28 °C puis bien mélanger avant utilisation.

## STOCKAGE ET PÉREMPTION DES RÉACTIFS

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

Table 8

## PRECAUTIONS

### PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

- Le calibrateur et les contrôles de cette trousse 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. 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.

## MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON INCLUS

- Pipettes de précision: 100 µL, 1000 µL
- Solution physiologique stérile de NaCl (0,9 %) pour la dilution des calibrateurs et des échantillons de sérum
- Microplaque, par exemple Maxisorp F8, NUNC corp. (méthode manuelle)
- Lecteur de microplaques à fonction de lecture cinétique ; chambre d'incubation à 37 °C (méthode manuelle)
- En option: si le lecteur de microplaques n'est pas doté d'un incubateur, un incubateur de microplaques externe à 37 °C est exigé, par exemple un modèle Eppendorf Thermomixer Comfort.
- En option: analyseur de chimie clinique capable de d'incuber à 37°C jusqu'à 15 minutes et de pipeter un volume d'échantillon d'environ 80 µL.

## PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Prélever au moins 250 µL de LCS par ponction lombaire. Conserver l'échantillon à 2-8 °C pendant un maximum de 24 heures, ou à -20 °C pour un stockage à plus long terme.

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.

## MODE OPÉRATOIRE DE DOSAGE

### Méthode manuelle

Vérifiez que la chambre de votre lecteur de microplaques peut être réglée sur 37 C en lecture cinétique. Programmez le lecteur pour une lecture cinétique de 30 minutes à 340 nm, avec des points expérimentaux toutes les minutes. Veillez à ce que les réactifs et les échantillons atteignent la température ambiante de 18-28 °C avant utilisation.

### Les échantillons de LCS ne doivent pas être dilués.

- Préparez une dilution au 1/5 du calibrateur avec une solution de NaCl 0,9 %, c'est-à-dire, par exemple, 60 µL du calibrateur et 240 µL de solution de NaCl.
- En option** : en cas de dosage de sérum, diluez au 1/5 les échantillons de sérum avec une solution de NaCl à 0,9 % (par exemple 60 µL de sérum et 240 µL de solution de NaCl).

**Pour éviter les effets de température au sein de la microplaque, ne remplissez pas la première et la dernière barrette, ainsi que le premier et le dernier puits de chaque barrette.**

Nous recommandons de mesurer chaque test en **double**.

- Pipetez 80 µL du calibrateur non dilué en double dans les puits B2 et B3.



4. Pipetez 80 µL du calibrateur dilué au 1/5 en double dans les puits C2 et C3.
5. Pipetez 80 µL des contrôles haut et bas en double, respectivement dans les puits D2, D3 et E2, E3.
6. Pipetez 80 µL d'échantillon de LCS et/ou d'échantillons de sérum dilué en double dans les puits suivants.
7. Pipetez 50 µL de substrat dans chaque puits de réaction.
8. Agitez délicatement la plaque. Démarrez la lecture à 340 nm et mesurez pendant 30 minutes.

**Remarque : Les trois premières minutes de la cinétique (points expérimentaux 1 à 3) correspondent à un temps de latence expérimental qui est nécessaire mais qui n'est pas pris en compte dans le calcul.**

#### TRAITEMENT DES DONNÉES

Calculez la pente ( $V_{max}$  = milli unités/min) pour les calibrateurs, les contrôles et les échantillons entre les temps 180 seconds et 1800 seconds.

Tracez une courbe d'étalonnage pour les deux étalons. Calculez les résultats des Contrôles et des échantillons.

**Définition :** une unité d'activité de l'ACE (U 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.

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

Voir Table 16 et Figure 1 pour des résultats standards. *Ces résultats et cette courbe d'étalonnage ne sont fournis qu'à titre d'exemple. Tracez une courbe d'étalonnage pour chaque nouveau jeu d'échantillons à doser.*

#### STANDARDISATION

La standardisation du dosage ACE haute sensibilité de BÜHLMANN se base sur le dosage cinétique ACE (KK-ACK) de BÜHLMANN.

#### APPLICATION AUX ANALYSEURS DE CHIMIE CLINIQUE

Le test peut être automatisé sur tout analyseur de chimie clinique analyseur de chimie clinique capable de d'incuber à 37°C jusqu'à 15 minutes et de pipeter un volume d'échantillon d'environ 80 µL.

#### Paramètres généraux de l'instrument

Type de test	photométrique
Unités du résultat	U/L (unités ACE par litre)
Type d'échantillon	LCS
Type d'étalonnage	linéaire
Direction de la courbe	descendante
Étalonnage	double
Substrat (R1)	80 µL
Incubation	90 s
Échantillon	80 µL
Incubation	120 s
Mesure	cinétique
Longueur d'onde	340 nm
Durée de mesure	900 s

#### CONTRÔLE QUALITÉ

Les valeurs des contrôles haut et bas 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 recommandent d'enregistrer les informations suivantes pour chaque dosage : n° de lot de la trousse, dates de reconstitution des réactifs utilisés, concentrations du calibrateur et des contrôles, concentration des échantillons du pool 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 icteriques 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.

#### CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

Les performances sont évaluées à partir de la méthode manuelle sur microplaques.

#### Limites de détection

**Limite du blanc (LOB) : 0,3 U ACE/L.** LOB est mesurée dans deux analyses indépendantes, avec un total de 84 détermination d'une solution de NaCl à 0,9 %. La LdB est calculée comme étant la moyenne + 2 écarts-types (SD).

**Limite de détection (LOD) : 1,0 U ACE/L.** LOD est mesurée par l'analyses de quatre échantillons indépendants de LCS additionnés de concentrations en ACE comprises entre 0,5 et 1,5 U/L. Les échantillons ainsi supplémentés sont mesurés 20 fois dans la même analyse. La LdD est calculée selon le protocole CLSI EP17-A.

**Limite de quantification (LOQ) : < 1,5 U ACE/L.** LOQ est mesurée a l'aide d'une solution de NaCl additionnée d'ACE entre 0,5 et 3,0 U/L. La mesure des échantillons ainsi supplémentés sont mesurés 10 fois chacun par échantillon dans deux analyses indépendantes. La limite de CV est fixée à 20 %.

**Linéarité : 1,0 - 24 U ACE/L.** Les dilutions en série de deux échantillons indépendants démontrent que la mesure est linéaire dans l'intervalle indiqué (voir Figure 2).

**Récupération : 97-119 %.** Quatre échantillons indépendants de LCS sont additionnés de quantités croissantes d'ACE avant d'être dosés selon le mode opératoire donné. La récupération dans l'intervalle linéaire du dosage est satisfaisante (voir Table 17).

**Précision : Répétabilité : < 11 % de CV ; Précision totale < 20 % de CV.** Des échantillons de LCS et une solution de NaCl additionnés d'ACE sont analysés sur une période de 10 jours. Chaque analyse d'échantillons est réaliser en double et testée indépendamment deux fois par jour (voir Table 18).

#### VALEURS NORMALES

178 couples LCS/sérum de patients ne souffrant pas de neurosarcoïdose sont mesurés par test ACE haute sensibilité. La valeur moyenne calculée est de 0,3 U/L. Le 95<sup>e</sup> percentile est de 1,3 U/L. La valeur maximale mesurée est de 1,9 U/L (voir Table 19).

En nous basant sur ces données normales, nous **proposons une valeur seuil à 2 U/L.** Toute valeur supérieure à 2 U/L doit être considérée comme élevée et potentiellement pathologique.

Il n'est pas possible d'établir un diagnostic différentiel de neurosarcoïdose en se basant sur une activité ACE supérieure à la normale dans le LCS. Il est nécessaire de mettre en oeuvre des tests supplémentaires pour exclure les maladies infectieuses possibles et les autres anomalies granulomateuses.

### COMPARAISON DES MÉTHODES

Les échantillons de LCS et de sérum de l'étude des valeurs normales sont employées pour étudier la corrélation entre l'application et les méthodes. La méthode de référence est le dosage ACE haute sensibilité. Les corrélations suivantes ont été établies:

Corrélation	n	R <sup>2</sup>	Biais	Pente
ACF vs. ACF Konelab	132	0,97	-0,11	1,284
ACF vs. ACF Mira	110	0,95	-0,35	1,058
ACF vs. ACD*	59	0,96	1,43	0,888
ACF vs. ACK	86	0,91	1,176	0,921

Table 9

\* Voir Figure 3

ACF: ACE, méthode manuelle haute sensibilité  
 ACF Konelab: ACE, application haute sensibilité sur KoneLab T30  
 ACF Cobas Mira: ACE, application haute sensibilité sur Cobas Mira  
 ACD: ACE, dosage radioenzymatique sensible direct (RK-ACD)  
 ACK: ACE, méthode de référence cinétique (KK-ACK) pour les échantillons sériques.

### USO PREVISTO

Il test ad alta sensibilità BÜHLMANN ACE (KK-ACF) è utilizzato per la determinazione diretta e quantitativa dell'attività dell'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE) nel liquido cerebrospinale (CSF) e in campioni di siero diluiti, mediante un dosaggio enzimatico.

### PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

L'ACE catalizza la reazione di conversione dell'Angiotensina I in Angiotensina II. L'enzima media inoltre il clivaggio di un substrato sintetico (FAPGG) in un derivato amminoacidico e un dipeptide. La cinetica della reazione di clivaggio è misurata seguendo la riduzione dell'assorbanza a 340 nm.

### REAGENTI FORNITI E LORO PREPARAZIONE

Reagente	Quantità	Codice	Ricostituzione
<b>Substrato</b>	1 fiala 11 ml	B-ACF-SUB	Pronto per l'uso
<b>Calibratore<sup>1</sup></b>	1 fiala liofilizzato	B-ACF-CA	Aggiungere 2 ml di acqua deionizzata
<b>Controlli<sup>2</sup></b> Basso e alto	2x 1 fiala liofilizzato	B-ACF- CONSET	Aggiungere 2 ml di acqua deionizzata

Table 10

<sup>1</sup> Calibratore ACE liofilizzato in matrice proteica tampone con attività lotto-specifica. Dopo ricostituzione lasciare per 15 minuti a 18-28 °C e mescolare bene prima dell'uso.

<sup>2</sup> Controlli ACE bassi e alti liofilizzati in matrice proteica tampone con attività lotto-specifica. Ricostituire per 15 minuti a 18-28 °C e mescolare bene prima dell'uso.

### CONSERVAZIONE E TEMPO DI CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Reagenti non aperti	
Stabile a 2-8 °C fino alla scadenza stampata sull'etichetta	
Reagenti aperti / Ricostituiti	
Substrato	Stabile fino alla scadenza a 2-8 °C
Calibratore	Stabile per 6 mesi a 2-8 °C
Controlli	

Table 11

### PRECAUZIONI

#### PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- Il calibratore e i controlli di questo kit 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: 100 µl, 1000 µl
- Soluzione di NaCl fisiologica sterile (0,9%) per il Calibratore e la diluizione del campione di siero
- Piastra per microtitolazione ad esempio Maxisorp F8, NUNC corp. (metodo manuale)
- Lettore di piastre per microtitolazione con funzione cinetica; camera di incubazione a 37 °C (metodo manuale)
- Facoltativo: Lavorando con un lettore senza incubatore, è necessario utilizzarne uno esterno per piastre di microtitolazione, per esempio, a 37 °C. Thermomixer comfort di Eppendorf.
- Facoltativo: Analizzatore di chimica clinica che permette un tempo di incubazione di 15 min e un pipettaggio di volumi del campione di ~80 µl.

#### PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Raccogliere almeno 250 µl di CSF (liquido cerebrospinale) tramite puntura lombare e conservarlo a 2-8 °C per un massimo di 24 h o a -20 °C per una conservazione prolungata.

#### PROCEDURA DEL TEST

##### Metodo manuale

Accertarsi che la camera del lettore di piastre per microtitolazione possa essere regolata a 37 °C – lettore cinetico. Programmare il lettore per una misura cinetica di 30 min a 340 nm; punti di misura ad ogni minuto.

Portare i reagenti e i campioni a 18-28 °C prima dell'uso.

##### Il campione di CSF deve essere utilizzato non diluito

1. Preparare una diluizione 1:5 del Calibratore con una soluzione di NaCl allo 0,9% (ad esempio 60 µl di Calibratore e 240 µl di soluzione di NaCl).
2. **Facoltativo:** Per testare i campioni di siero in questo dosaggio preparare una diluizione 1:5 dei campioni di siero con una soluzione di NaCl allo 0,9% (ad esempio 60 µl di siero e 240 µl di soluzione di NaCl).

**Al fine di evitare gli effetti della temperatura all'interno della micropiastra, lasciare vuota la prima e l'ultima striscia del test e il primo e l'ultimo pozzetto di ogni striscia.**

Si consiglia di effettuare il test **in doppio**.

3. Pipettare 80 µl di Calibratore (non diluito) dei duplicati nei pozzetti B2 e B3.
4. Pipettare 80 µl di Calibratore (diluizione 1:5) nei duplicati nei pozzetti C2 e C3.
5. Pipettare 80 µl di Controllo basso e alto nei duplicati nei pozzetti D2, D3 ed E2, E3, rispettivamente.
6. Pipet 80 µl dei campioni di CSF (e/o di campioni di siero diluito) nei duplicati nei seguenti pozzetti.
7. Pipettare 50 µl di substrato in ciascun pozzetto di reazione.
8. Agitare delicatamente la piastra e iniziare la lettura a 340 nm per 30 min.

**Nota: è importante osservare un tempo di attesa di circa 3 minuti. Pertanto ignorare i punti di misurazione 1-3 per il calcolo (tempo di pre-incubazione).**

#### RISULTATI

Calcolare la pendenza ( $V_{max}$  = milliunità/min) dei Calibratori, dei controlli e dei campioni da 180 s a 1800 s.

Creare una curva di calibrazione con i due calibratori e calcolare i risultati dei controlli e dei campioni.

**Definizione:** Un'unità di attività ACE è definita come la quantità di enzima richiesta per rilasciare una µmole di acido ippurico per minuto e per litro di siero a 37 °C:

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

In Table 16 e Figure 1 sono riportati dati tipici. *Questi risultati e la curva standard sono forniti unicamente a scopo dimostrativo. Deve essere generata una curva standard per ciascun set di campioni da dosare.*

#### APPLICAZIONE SU ANALIZZATORI DI CHIMICA CLINICA

Il test può essere automatizzato su qualsiasi analizzatore di chimica clinica che permetta un tempo di incubazione >15 min e un volume del campione di 80 µl.

#### Impostazioni generali dell'apparecchio

Tipo di test	fotometrico
Unità di misura	U/l (unità di ACE per litro)
Tipo di campione	CSF
Tipo di calibrazione	lineare
Andamento della curva	discendente
Taratura	duplicato
Substrato (R1)	80 µl
Incubazione	90 sec
Campione	80 µl
Incubazione	120 sec
Lettura	cinetica
Lunghezza d'onda	340 nm
Tempo di lettura	900 sec

#### CONTROLLO DI QUALITÀ

I valori dei controlli interni basso e alto forniti con il kit devono essere compresi nell'intervallo specifico del lotto, indicato sulla corrispondente scheda tecnica. In caso contrario, il dosaggio deve essere ripetuto.

È buona pratica di laboratorio registrare i seguenti dati per ciascun dosaggio: numero di lotto del kit, date di ricostituzione dei componenti del kit, valore di concentrazione del calibratore e dei controlli, valori di concentrazione dei campioni del pool interno.

#### STANDARDIZZAZIONE

La standardizzazione del dosaggio ad alta sensibilità BÜHLMANN ACE è basata sul dosaggio cinetico dell'ACE (KK-ACK) fornito da BÜHLMANN.

#### CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

I dati sono stati stabiliti con il metodo manuale in micropiastra.

##### Limiti di rilevabilità

**Limite del Bianco (LoB): 0,3 U/l di ACE.** Il LoB è stato stabilito in due run indipendenti con un totale di 84 valori di bianco con soluzione di NaCl allo 0,9%. Il LoB è calcolato come media + 2 SD

**Limite di rilevabilità (LoD): 1,0 U/l di ACE.** Il LoD è stato stabilito con quattro campioni indipendenti di CSF addizionati con una concentrazione di ACE compresa tra 0,5 e 1,5 U/l. I campioni addizionati sono stati misurati nello stesso run 20 volte. Il LoD è stato calcolato in conformità

con il Protocollo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A.

**Limite di Quantificazione (LoQ): <1,5 U/I DI ACE.** Il LoQ è stato stabilito con una soluzione di NaCl addizionata con ACE tra 0,5 e 3,0 U/I. I campioni addizionati sono stati dosati 10 volte ciascuno in due run indipendenti,. È stato applicato un limite del 20% di CV.

**Linearità: 1,0-24 U/I DI ACE.** La diluizione seriale di due campioni indipendenti ha mostrato linearità all'interno dell'intervallo indicato (cfr. Figure 2).

**Recupero: 97-119%.** Quattro campioni indipendenti di CSF sono stati addizionati con una concentrazione crescente di ACE e misurati secondo la procedura prevista per il test. È stato trovato un buon recupero all'interno dell'intervallo di linearità del test (cfr. Table 17).

**Precisione: Riproducibilità: <11% CV; Precisione totale <20% CV.** Campioni di CSF e una soluzione di NaCl addizionati con ACE sono stati dosati per un periodo di 10 giorni. Ciascun campione è stato analizzato in doppio e dosato, in modo indipendente, due volte al giorno (cfr. Table 18).

### VALORI NORMALI

178 coppie CSF/siero provenienti da pazienti non neurosarcoideotici sono state testate con il dosaggio ACE ad alta sensibilità. Il valore medio calcolato è 0,3 U/I, il 95° percentile è a 1,3 U/I e il valore massimo misurato è 1,9 U/I (cfr. Table 19).

Sulla base di questi valori normali BÜHLMANN propone un cut-off a 2 ACE U/I. Valori di ACE >2 U/I devono essere considerati elevati e potenzialmente patologici. Non è possibile una diagnosi differenziale di neurosarcoideosi basata su un'elevata attività di ACE nel CSF. Sono necessarie indagini ulteriori per escludere possibili malattie infettive o altre anomalie granulomatosiche.

### CONFRONTO DEI METODI

Campioni di CSF e di siero derivanti dallo studio del valore normale sono stati utilizzati per la correlazione tra le applicazioni e i metodi. Utilizzando il dosaggio ACE ad alta sensibilità come metodo di riferimento, sono state trovate le seguenti correlazioni:

Correlazione	n	R <sup>2</sup>	Bias	Pendenza
ACF vs ACF Konelab	132	0,97	-0,11	1,284
ACF vs ACF Cobas Mira	110	0,95	-0,35	1,058
ACF contro ACD*	59	0,96	1,43	0,888
ACF contro ACK	86	0,91	1,176	0,921

Tabella 12

\*cfr. Figure 3

ACF: Metodo manuale ad alta sensibilità ACE

ACF Konelab: Applicazione ACE ad alta sensibilità su KoneLab T30

ACF Cobas Mira: Applicazione ACE ad alta sensibilità su Cobas Mira

ACD: Dosaggio radio-enzimatico sensibile ACE diretto (RK-ACD)

ACK: Metodo di riferimento ACE cinetico (KK-ACK) per campioni di siero.

## ESPAÑOL

### USO PREVISTO

El ensayo BÜHLMANN ACE de alta sensibilidad (KK-ACF) ha sido diseñado para la determinación directa y cuantitativa por ensayo enzimático de la actividad de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) en fluido cerebroespinal (FCE) y en muestras de suero diluidas.

### PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

La ACE cataliza la conversión de la angiotensina I a angiotensina II. La enzima también media para la segmentación del sustrato sintético (FAPGG) en un derivado de aminoácido y un dipéptido. La cinética de esta reacción de segmentación se mide registrando el decrecimiento de la absorbancia a 340 nm.

### REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivo	Cantidad	Código	Reconstitución
Sustrato	1 vial 11 ml	B-ACF-SUB	Listo para su uso
Calibrador <sup>1</sup>	1 vial liofilizado	B-ACF-CA	Añadir 2 ml de agua desionizada
Contrôles bajo y alto	2 x 1 vial liofilizado	B-ACF- CONSET	Añadir 2 ml de agua desionizada

Table 13

<sup>1</sup> Calibrador de ACE liofilizado en matriz tamponada de proteínas con actividad específica por lote. Después de reconstituir, dejar 15 minutos a 18-28°C y mezclar bien antes de su uso.

<sup>2</sup> Control bajo y alto de ACE liofilizados en matriz tamponada de proteínas con actividad específica por lote. Reconstituir durante 15 minutos a 18-28°C y mezclar bien antes de su uso.

### 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	
Sustrato	Estable hasta la fecha de caducidad a 2-8°C
Patrón	Estables durante 6 meses a 2-8°C
Controles	

Table 14

### 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: 100 µl, 1000 µl
- Suero fisiológico estéril de NaCl (0,9%) para las diluciones del calibrador y muestras de suero.
- Placas de microtitulación  
p.ej. Maxisorp F8, NUNC corp. (método manual)
- Lector de placas de microtitulación con función cinética; cámara de incubación a 37°C (método manual).
- Opcional: Si se trabaja con un lector sin incubador, se necesita una incubadora de placas de microtitulación a 37°C externa, p.ej., Eppendorf Thermomixer comfort.
- Opcional: Analizador químico-clínico que permita un tiempo de incubación de 15 min y la dispensación de volúmenes de muestra de ~80 µl.

### OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

Tomar al menos 250 µl de FCE por punción lumbar y almacenarlo a 2-8°C hasta 24 h o a -20°C para almacenamiento más prolongado.

### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

#### Método manual

Asegurarse de que la cámara del lector de placas de microtitulación puede ajustarse a 37°C – lectura cinética. Programar el lector para medidas cinéticas durante 30 min a 340 nm, tomando un punto cada minuto.

Dejar los reactivos y muestras atemperarse a 18-28°C antes de su uso.

**Las muestras de FCE tienen que usarse sin diluir.**

1. Preparar un dilución 1:5 del calibrador con NaCl 0,9% (p.ej. 60 µl de calibrador y 240 µl de solución de NaCl)
2. **Opcional:** Si se van a ensayar muestras de suero, preparar diluciones 1:5 de éstas con solución de NaCl 0,9% (p.ej. 60 µl de suero y 240 µl de solución de NaCl).

**Para evitar los efectos de la temperatura dentro de la microplaca, dejar vacías las tiras primera y última del ensayo así como el primer y último pocillo de cada tira.**

Se recomienda aplicar el ensayo por duplicado.

3. Pipetear 80 µl de calibrador (sin diluir) por duplicado en los pocillos B2 y B3.
4. Pipetear 80 µl de calibrador (diluido 1:5) por duplicado en los pocillos C2 y C3.
5. Pipetear 80 µl de control bajo y alto por duplicado en los pocillos D2, D3 y E2, E3, respectivamente.
6. Pipetear 80 µl de muestra de FCE (y/o muestras de suero diluidas) por duplicado en los pocillos siguientes.
7. Pipetear 50 µl de sustrato en cada pocillo de reacción.
8. Agitar suavemente la placa y comenzar las lecturas a 340 nm durante 30 min.

**Nota: Es importante mantener un tiempo de espera inicial de 3 minutos. Por tanto, desestimar los puntos de lectura 1-3 para los cálculos (tiempo pre-incubación).**

### REDUCCIÓN DE DATOS

Calcular la pendiente ( $V_{max}$  = mili unidades/min) de los calibradores, controles y muestras desde 180 s a 1800 s.

Crear una curva de calibración con los dos calibradores y calcular los resultados de controles y muestras.

**Definición:** Una unidad de actividad de ACE se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un µmol de ácido hipúrico por minuto y litro de suero a 37°C:

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

Ver Table 16 y Figure 1 para datos típicos. *Estos resultados y la curva de calibrado se incluyen sólo con objeto de demostración. Debe generarse una curva de patrones para cada tanda de muestras a ensayar.*

### APLICACIÓN EN ANALIZADORES QUÍMICO-CLÍNICOS

El ensayo puede automatizarse con cualquier analizador químico-clínico que permita un tiempo de incubación de > 15 min y volúmenes de muestra de 80 µl.

#### Ajustes generales del equipo

Tipo de test	fotométrico
Unidades del resultado	U/l (unidades de ACE por litro)
Tipo de muestra	FCE
Tipo de calibración	lineal
Dirección de la curva	descendente
Calibración	duplicados
Sustrato (R1)	80 µl
Incubación	90 seg
Muestra	80 µl
Incubación	120 seg
Medida	cinética
Longitud de onda	340 nm
Tiempo de medida	900 seg

### ESTANDARIZACIÓN

La estandarización del ensayo para ACE de alta sensibilidad BÜHLMANN se basa en el ensayo cinético de la ACE (KK-ACK) de BÜHLMANN.

### CONTROL DE CALIDAD

Los valores de los controles internos alto y bajo incluidos en el kit deben estar dentro del rango especificado para el lote, indicado en el correspondiente folleto de datos. En caso de no ser así, el ensayo debe ser repetido.

Constituye una buena práctica 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](http://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 LA EFICIENCIA

Los datos de eficiencia se han establecido con el método manual sobre placas de microtitulación.

### Límites de detección

**Límite para el blanco (LoB): 0,3 U/L ACE.** El LoB se ha establecido en dos tandas de lecturas independientes con un total de 84 valores para el blanco con solución de NaCl al 0,9%. El LoB se calcula como la media + 2SD.

**Límite de Detección (LoD): 1,0 U/L ACE.** El LoD se ha establecido con 4 muestras independientes de FCE con adición de ACE entre 0,5 y 1,5 U/L. Las muestras adicionadas se midieron en una misma tanda 20 veces. El LoD se ha calculado de acuerdo con el protocolo CLSI EP17-A.

**Límite de Cuantificación (LoQ): <1,5 U/L ACE.** El LoQ se ha establecido con soluciones de NaCl adicionadas de ACE entre 0,5 y 3,0 U/L. Las muestras adicionadas se ensayaron 10 veces en dos tandas independientes, cada una. Se aplicó un límite de 20% CV.

**Linealidad: 1,0-24 U/L ACE.** Diluciones seriadas de dos muestras independientes mostraron linealidad dentro del rango indicado (cf. Figura 2).

**Recuperación: 97-119%.** Se adicionaron cuatro muestras independientes de FCE con concentraciones crecientes de ACE y se midieron de acuerdo al procedimiento de ensayo. Se consiguieron buenas recuperaciones dentro del rango lineal del ensayo (cf. Tabla 5).

**Precisión: Repetibilidad: <11% CV; Precisión total <20% CV.** Se ensayaron diversas muestras de FCE y solución de NaCl adicionada con ACE durante un período de 10 días. Cada muestra se analizó por duplicado e independientemente dos veces por día (cf. Tabla 6).

## INTERVALOS DE REFERENCIA

Se ensayaron 178 pares de suero/FCE de pacientes no neurosarcoidóticos con el ensayo ACE de alta sensibilidad.

El valor medio calculado es 0,3 U/L, el percentil 95 está a 1,3 U/L y el valor máximo medido es 1,9 U/L (cf. Tabla 7).

Con base a estos datos normales, BÜHLMANN propone un punto de corte de 2 U/L de ACE. Los valores >2 U/L de ACE deberían considerarse elevados y potencialmente patológicos.

No es posible realizar una diagnosis diferencial de neurosarcoidosis basándose en una actividad de ACE elevada. Se precisan investigaciones complementarias para excluir posibles enfermedades infecciosas u otras anomalías granulomatosas.

## COMPARACIÓN DE MÉTODOS

Se utilizaron muestras de suero y FCE del estudio de valores normales para la correlación entre métodos y aplicaciones. Se obtuvieron las siguientes correlaciones al usar el ensayo ACE de alta sensibilidad como método de referencia:

Correlación	n	R <sup>2</sup>	Desfase	Pendiente
ACF vs. ACF Kone	132	0,97	-0,11	1,28
ACF vs. ACF Mira	110	0,95	-0,35	1,06
ACF vs. ACD*	59	0,96	1,43	0,89
ACF vs. ACK	86	0,91	1,18	0,92

Table 15

\* cf. Figura 3

ACF: Método manual ACE de alta sensibilidad  
ACF Kone: aplicación ACE de alta sensibilidad en KoneLab T30  
ACF Mira: aplicación ACE de alta sensibilidad en Cobas Mira  
ACD: ensayo radio-enzimático sensible directo ACE (RK-ACD)  
ACK: método de referencia ACE cinético (KK-ACK) para muestras de suero.

Table 16 Example of Results

Sample	Wells	Rate	Result	Mean Result	SD	CV%
Cal1	C2	-2.013	10.963	10.8	0.163	1.5
	C3	-1.959	10.637			
Cal2	D2	-0.561	2.145	2.16	0.015	0.7
	D3	-0.566	2.175			
con high	E3	-1.051	5.118	5.1	0.0285	0.6
	E4	-1.041	5.061			
con low	E2	-0.221	0.076	0.1		
	E2	-0.221	0.076			
S1	F2	-0.299	0.55	0.3	0.219	66.2
	F3	-0.227	0.112			
S2	G2	-0.437	1.392	1.3	0.1095	8.8
	G3	-0.401	1.173			
S3	B5	-0.458	1.518	1.6	0.061	3.8
	B6	-0.478	1.64			
S4	C5	-0.837	3.818	3.9	0.0795	2.0
	C6	-0.863	3.977			
S5	D5	-1.617	8.562	8.5	0.0445	0.5
	D6	-1.603	8.473			
S6	E5	-2.367	13.115	13.2	0.048	0.4
	E6	-2.383	13.211			
S7	F5	-4.01	23.097	23.0	0.003	0.0
	F6	-4.009	23.091			

Table 17 Recovery

Spiked With [U/L]	S1		S2		S3		S4	
	Obs [U/L]	O/E [%]	Obs [U/L]	O/E [%]	Obs [U/L]	O/E [%]	Obs [U/L]	O/E [%]
1.5	1.29	86.2	1.80	120.3	2.30	153.6	1.63	108.5
2	1.64	81.8	2.63	131.4	2.70	134.8	2.30	114.8
4	4.00	100.0	4.80	120.0	4.69	117.1	5.94	148.5
8	8.56	107.0	8.75	109.4	8.65	108.1	8.71	108.9
12	13.29	110.7	12.35	102.9	12.81	106.8	12.11	100.9
24	23.20	96.7	22.21	92.5	22.21	92.5	22.34	93.1
<b>Mean</b>		<b>97.1</b>		<b>112.7</b>		<b>118.8</b>		<b>112.4</b>

Table 18 Precision

Sample	U/L	Repeatability (Within Run)	Between Run	Between Day	Total Precision
S1	2.1	8.6%	11.7%	9.9%	17.5%
S2	4.1	8.0%	4.0%	7.3%	11.5%
S3	5.3	10.4%	5.9%	13.8%	18.3%
S4	10.6	5.8%	4.7%	4.4%	8.6%
S5	19.7	1.3%	3.7%	1.7%	4.3%

Figure 1 Example of Calibration

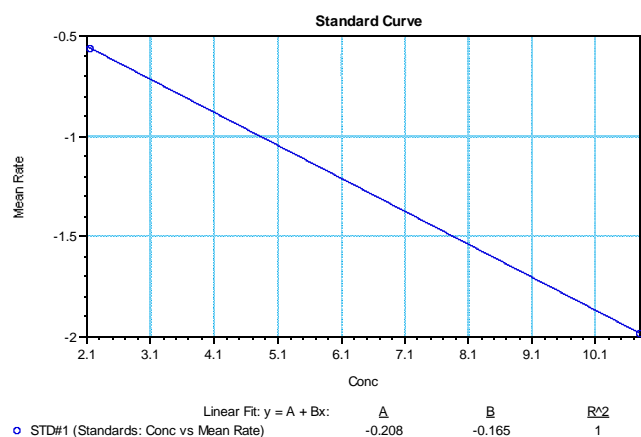


Table 19 Normal Values

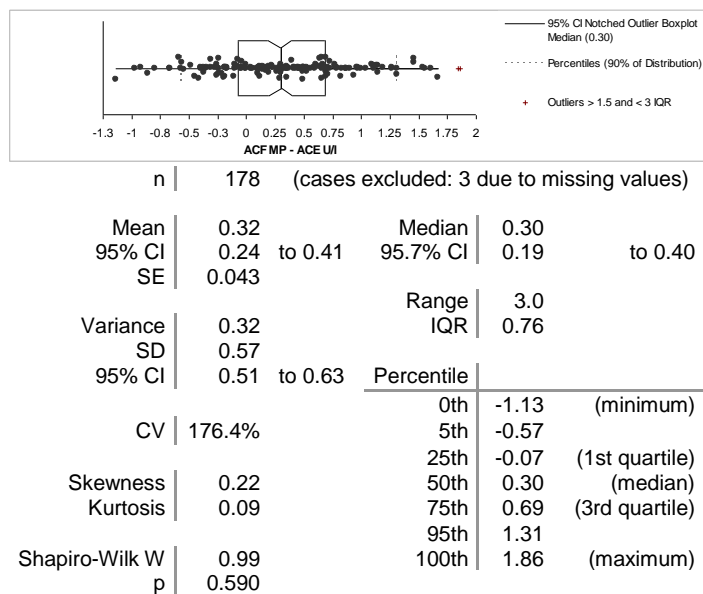


Figure 2 Linearity

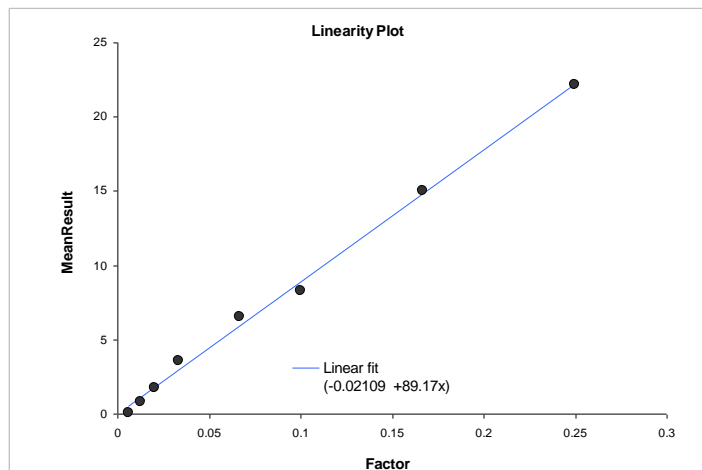
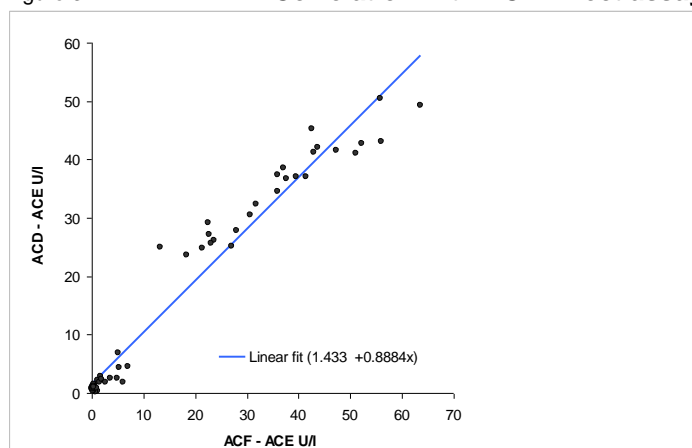






Figure 3 Correlation with ACE Direct assay



Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
<b>REF</b>	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
<b>LOT</b>	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
<b>IVD</b>	<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
<b>CONTROL L</b>	Low Control Kontrolle niedrig Contrôle bas Controllo basso Control bajo
<b>CONTROL H</b>	High Control Kontrolle hoch Contrôle Elevé Controllo alto Control Alto
<b>CAL</b>	Calibrator Kalibrator Calibrateur Calibratore Calibrador
<b>SUBS</b>	Substrate Substrat Substrat Substrato Substrato

