

ACE high sensitive

Angiotensin Converting Enzyme in Cerebrospinal Fluid (CSF)

KK-ACF

Revision date: 2010-12-24

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 ¹	1 vial lyophilized	B-ACF-CA	Add 2 ml of deionized water
Controls ² Low and high	2x 1 vial lyophilized	B-ACF- CONSET	Add 2 ml of deionized water

Table 1

¹ 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.

² 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

WARNINGS AND PRECAUTIONS

The calibrator and controls of this kit contain components of human origin. Each serum used to prepare the kit components was tested by an FDA approved method and found negative for HBV surface antigen, as well as for HCV and HIV1/2 antibodies. Although these methods are highly accurate, there is no guarantee that this material cannot transmit Hepatitis or AIDS. *Therefore, all patient specimens and kit components should be handled as potentially infectious.* All products containing human source material should be handled according to good laboratory practice using appropriate precautions.

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.

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.

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:

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

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.

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)

NORMAL VALUES

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 95th 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 ²	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.

DEUTSCH

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 REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

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

Tabelle 4

¹ 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.

² 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 Verpackungsetikette. 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

Alle Reagenzien enthalten Komponenten menschlicher Herkunft. Jedes einzelne Spenderserum wurde mittels einer FDA genehmigten Methode auf HBV Oberflächen Antigen, sowie auf HCV und HIV1/2 Antikörper getestet, und als negativ freigegeben. Trotz hoher Genauigkeit dieser Methoden kann keine Garantie gewährleistet werden, dass die Materialien nicht Hepatitis oder AIDS übertragen können. *Aus diesem Grunde müssen alle Kit Komponenten sowie die Patientenproben als infektiös betrachtet werden.* Alle Produkte, welche menschliches Material enthalten, müssen mit größter Vorsicht und nach den Vorgaben der Guten Labor Praxis verarbeitet werden.

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 Pipettivolumen 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.

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, verwerfen 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:

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

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).

LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsmerkmale wurden mit der Handmethode auf Mikrotiterplatten evaluiert.

Nachweiskgrenzen

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 und 1.5 U/L gespickt wurden. Die gespickten 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 und 3.0 U/L gespickt wurde. Die gespickten 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 gespickt 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 gespickt wurden, wurden über eine Periode von 10 Tagen gemessen. Dazu wurde jede Probe zweimal täglich in Doppelbestimmungen gemessen (siehe Table 18).

NORMALWERTE

178 CSF/Serum Paare von Patienten ohne Neuro-sarkoidose wurden mit dem BÜHLMANN ACE high sensitive Assay getestet. Der errechnete Mittelwert beträgt 0.3 U/L, die 95th 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 ²	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).

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

¹ 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.

² 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

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

Le calibrateur et les contrôles de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine. Chaque unité de sérum utilisée dans la préparation des réactifs de la trousse a été testée par une méthode approuvée par la FDA. Elle est séronégative pour l'antigène de surface du virus de l'hépatite B, pour le virus de l'hépatite C et pour les anticorps anti-VIH1/2. Bien que ces méthodes soient d'une exactitude remarquable, il ne peut être garanti que ce matériel ne puisse transmettre une hépatite ou le SIDA. *En conséquence, tous les échantillons de donneur et réactifs de la trousse doivent être manipulés comme des substances potentiellement infectieuses.* Tous les produits contenant du matériel d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire avec les précautions correspondantes.

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.

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.

1. 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.
2. **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**.

3. 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 mesurer 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.

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

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.

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.

NORMALISATION

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

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 à 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 réalisée 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^e 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 ²	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
Substrato	1 fiala 11 ml	B-ACF-SUB	Pronto per l'uso
Calibratore ¹	1 fiala liofilizzato	B-ACF-CA	Aggiungere 2 ml di acqua deionizzata
Controlli ² Basso e alto	2x 1 fiala liofilizzato	B-ACF- CONSET	Aggiungere 2 ml di acqua deionizzata

Table 10

¹ 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.

² 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

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Il calibratore e i controlli di questo kit contengono componenti di origine umana. Tutto il siero utilizzato per preparare i componenti del kit è stato testato con metodo approvato dall'FDA ed è risultato negativo per l'antigene di superficie per l'HBV, così come per gli anticorpi HCV e HIV1/2. Sebbene questi metodi siano molto accurati, non vi sono garanzie che questi materiali non possano trasmettere l'epatite o l'AIDS. *Pertanto, sia i campioni che i componenti del kit devono essere maneggiati come potenzialmente infetti.* Tutti i prodotti contenenti materiale di origine umana dovrebbero essere maneggiati seguendo le idonee precauzioni dettate dalla buona pratica di laboratorio.

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 μ mole di acido ippurico per minuto e per litro di siero a 37 °C:

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

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 μ l.

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 μ l
Incubazione	90 sec
Campione	80 μ l
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.

PERFORMANCE

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/l di ACE. Il LoQ è stato stabilito con una soluzione di NaCl addizionata con ACE tra 0,5 e 3,0 U/l. 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/l 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 neurosarcoidotici sono state testate con il dosaggio ACE ad alta sensibilità. Il valore medio calcolato è 0,3 U/l, il 95° percentile è a 1,3 U/l e il valore massimo misurato è 1,9 U/l (cfr. Table 19).

Sulla base di questi valori normali BÜHLMANN propone un cut-off a 2 ACE U/l. Valori di ACE >2 U/l devono essere considerati elevati e potenzialmente patologici. Non è possibile una diagnosi differenziale di neurosarcoidosi 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 ²	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.

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
Calibrador¹	1 vial liofilizado	B-ACF-CA	Añadir 2 ml de agua desionizada
Contróles bajo y alto	2 x 1 vial liofilizado	B-ACF- CONSET	Añadir 2 ml de agua desionizada

Table 13

¹ 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.

² 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

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

El calibrador y los controles de este kit contienen componentes de origen humano. Todos los sueros utilizados para preparar los componentes del kit han sido analizados por un método aprobado por la FDA, dando resultados negativos para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, y para los anticuerpos del virus de la hepatitis C y VIH1/2 (virus de inmunodeficiencia humana 1/2). Aunque estos métodos son extremadamente fiables, no se garantiza que este material no pueda transmitir hepatitis o SIDA. *Por consiguiente, todas las muestras de pacientes y todos los componentes del kit deben ser manipulados como si fueran susceptibles de transmitir infecciones.* Todos los productos que contengan material de origen humano deben ser manipulados de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio tomando las precauciones adecuadas.

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:

$$1 \text{ unidad ACE} = \frac{1 \mu\text{mol ácido hipúrico}}{\text{min} \times \text{L}} = 1 \text{ U / L}$$

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

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.

ESTANDARIZACIÓN

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

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).

VALORES NORMALES

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 ²	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		
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
Mean		97.1		112.7		118.8		112.4

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

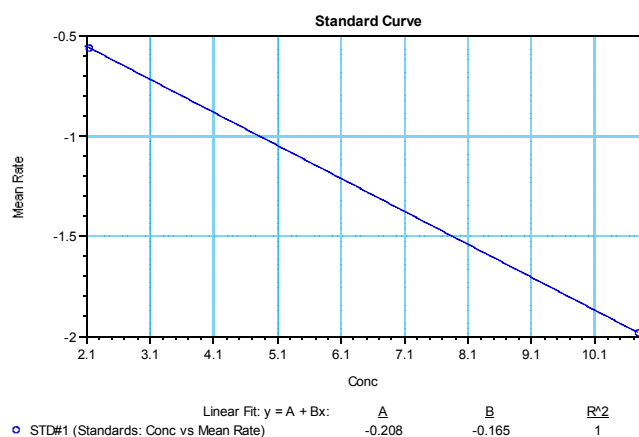
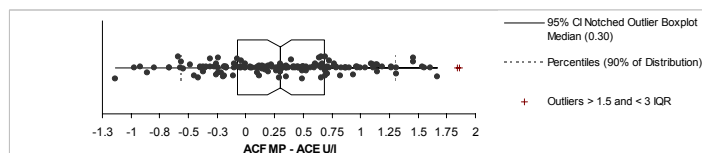


Table 19

Normal Values



n	178 (cases excluded: 3 due to missing values)			
Mean	0.32	Median	0.30	
95% CI	0.24 to 0.41	95.7% CI	0.19 to 0.40	
SE	0.043			
Variance	0.32	Range	3.0	
SD	0.57	IQR	0.76	
95% CI	0.51 to 0.63	Percentile		
CV	176.4%	0th	-1.13 (minimum)	
		5th	-0.57	
		25th	-0.07 (1st quartile)	
Skewness	0.22	50th	0.30 (median)	
Kurtosis	0.09	75th	0.69 (3rd quartile)	
		95th	1.31	
Shapiro-Wilk W	0.99	100th	1.86 (maximum)	
p	0.590			

Figure 2

Linearity

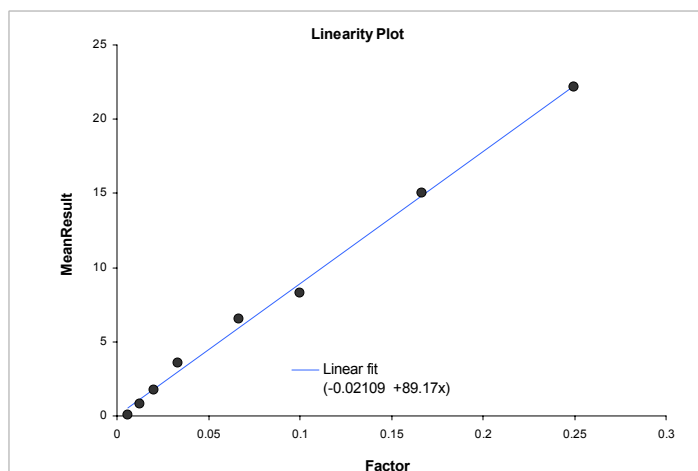
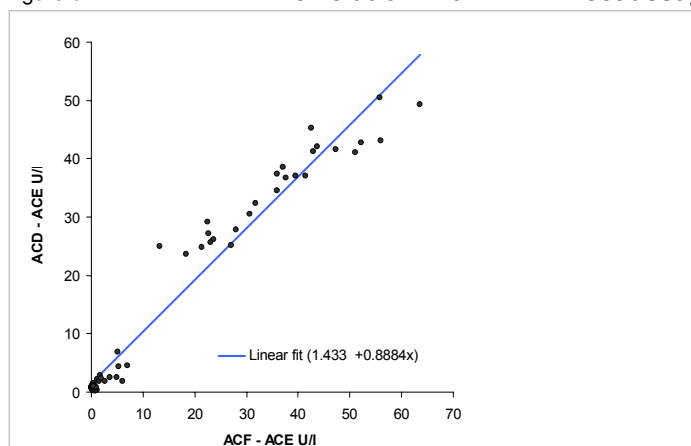


Figure 3

Correlation with ACE Direct assay



APPENDIX I
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 L	Low Control Kontrolle niedrig Contrôle bas Controllo basso Control bajo
CONTROL H	High Control Kontrolle hoch Contrôle Elevé Controllo alto Control Alto
CAL	Calibrator Kalibrator Calibrateur Calibratore Calibrador
SUBS	Substrate Substrat Substrat Substrato Substrato

