



ACE direct

Angiotensin Converting Enzyme REA

RK-ACD 100 tests

Revision date: 2007-09-27

ENGLISH

INTENDED USE

The BÜHLMANN ACE radioenzymatic assay (REA) is intended for the direct and quantitative determination of angiotensin converting enzyme (ACE) activity in serum (1-3).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

Angiotensin converting enzyme (ACE) catalyzes the conversion of angiotensin I to angiotensin II. The enzyme also mediates the cleavage of a synthetic substrate, ³H-hippuryl-glycyl-glycine, into ³H-hippuric acid and the glycyl-glycine dipeptide (4). After acidification, the tritiated hippuric acid is separated from unreacted substrate by extraction with scintillation cocktail and measured in a beta counter.

This test has been standardized with the BÜHLMANN ACE Colorimetric kit (order code: KK-ACE) according to the method described in references 5 and 6.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Tracer ³ H-hippuryl-glycyl-glycine in HEPES buffer (pH=8.0)	1 vial 11 ml	B-ACD-TR	Ready to use
Calibrator¹⁾ lyophilized human serum	1 vial	B-ACD-CA	Reconstitute with 1 ml of deionized water and swirl gently to dissolve
Zero Calibrator lyophilized human serum free of any ACE activity	1 vial	B-ACD-0CA	Reconstitute with 1 ml of deionized water and swirl gently to dissolve
Control Normal /High¹⁾ lyophilized human serum	2 vials	B-ACD- CONSET	Reconstitute with 1 ml of deionized water and mix well before use
HCl Solution 1N hydrochlorid acid	1 vial 6 ml	B-ACD-HA	Ready to use
Scintillation Powder²⁾ Premixed	1 vial	B-ACD-SCP	Dissolve with 120 ml xylene and 40 ml of ethyl acetate, mix well

Table 1

¹⁾ Lot specific ACE activity in human serum matrix. Refer to the additional QC data sheet for exact concentrations.

²⁾ The following **non-xylene** scintillation fluid is an acceptable substitute for the scintillation powder: Ultima Gold F (PerkinElmer no. 6013179). Mix 120 ml of Ultima Gold F with 40 ml of ethyl acetate to obtain the scintillation reagent. Store in brown glass bottle for up to 6 months at 18-28°C.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
Store at 2-8°C until expiration date printed on the label HCl Solution and Scintillation Powder can be stored at 18-28°C.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Tracer	Stable at 2-8°C until expiration date marked on the label
Calibrator	Stable for 2 months at -20°C
Zero Calibrator	
Controls	
HCl Solution	Stable at 18-28°C until expiration date printed on the label
Scintillation Powder	Stable for 6 months at 18-28°C if stored in a brown glass bottle

Table 2

WARNINGS AND PRECAUTIONS

This kit contains radioactive material which does not exceed 188 kBq (5.0 µCi) of tritium (³H). The receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the local regulations. Concerning the proper precautions for the handling and disposal of kit reagents, radioactive material, radioactive waste and patient specimens, we highly recommend to first consult the special local regulations of your country.

Reagents Containing Human Source Material: The Calibrator (B-ACD-CA) the Zero Calibrator (B-ACD-CA0)

and the Controls (B-ACD-CONSET) of this kit contain components of human origin. Each serum used in the preparation of the kit components was tested by a FDA-approved method and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies. Although those 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 if capable of transmitting infections.* All products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 10 µl, 50 µl, 100 µl and 1000 µl precision pipettes with disposable tips.
- Disposable 2 ml polypropylene tubes with tight screw-caps for the assay (preferably Sarstedt Minutubes no. 72.693).
- Cylinders and brown glass bottle for the preparation of the scintillation cocktail.
- Double distilled or deionized water.
- Xylene p.a. (e.g. Merck no. 8681) or, alternatively, Ultima Gold F scintillation fluid (PerkinElmer no. 6013179).
- Ethyl acetate p.a. (e.g. Merck no. 9623)
- 10 ml scintillation vials.
- Vortex mixer.
- Water bath set at 37°C.
- Beta counter.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Serum: Since **EDTA inhibits** the ACE activity, only serum specimen must be used for the determination of ACE activity: Collect sufficient blood (at least 1 ml) by venipuncture into a plastic syringe or a venipuncture tube without any anticoagulant. Let stand the blood for 2-3 hours at 18-28°C, then centrifuge at 2-8°C and collect the serum. Freeze the serum specimen at -20°C or lower 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 or lower.

Lipemic sera do not interfere in the ACE REA assay.

Note: Many authors (e.g.7,8) have reported that ACE activity in patients under captopril medication increases as a function of the duration of storage. To prevent any loss of ACE inhibition, sera of patients under captopril medication should be assayed within 4 hours after blood collection. For storage up to 12 days, these specimen should be kept at -70°C (dry ice). This phenomenon does not occur in sera of patients treated with other ACE inhibitors such as enalapril (8).

Other specimen: Extraction procedures for urine and tissue specimen are described in references 9 to 11.

ASSAY PROCEDURE

1. Prepare 6 minitubes in duplicate for the blank (zero calibrator), the calibrator and the control serum. Prepare additional tubes in duplicate for each patient specimen.

Note: Do label neither tubes, nor caps. Any mark would reduce the counting efficiency!

2. Pipet 10 µl of the "zero" calibrator, calibrator, controls and patient samples, respectively, into the corresponding tubes.
3. Add 100 µl of tritiated substrate (Tracer) to each minitube. Vortex all tubes for at least 5 seconds.
4. Incubate all tubes for 60 minutes ± 5 minutes in a water bath at 37°C.
5. Add 50 µl of 1 N hydrochloric acid solution to each tube.

Vortex.

- Pipet 1.5 ml of scintillation cocktail into the tubes. Screw the caps strongly and vortex for 5 seconds.

Note: Let the minitubes stand for at least 1 hour before counting.

- Place each tube into a scintillation vial and count for 5 minutes in a beta counter.

RESULTS

Calculation: Record the cpm for all tubes (blank, calibrator, controls, samples) and calculate the mean cpm for each pair of tubes. Subtract the mean assay blank from the respective mean of each pair of tubes:

net counts = average cpm - average blank cpm

Calculate the corresponding ACE activity of the sample or control by dividing the net counts of the sample or control by the net calibrator counts and multiply by the ACE activity of the calibrator, A_s , (indicated on the calibrator vial):

$$\text{ACE activity} = \frac{\text{net counts for sample}}{\text{net counts for calibrator}} \times A_s$$

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

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

Standardization: The values obtained with this assay are identical to the values received with the standard colorimetric assay kit from BÜHLMANN LABORATORIES AG (order code: KK-ACE).

This standardization has the advantage that results obtained with either the colorimetric method (KK-ACE), the kinetic method (KK-ACK) or the radioenzymatic method (RK-ACD) are intercomparable.

QUALITY CONTROL

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

The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the QC Data Sheet added to the kit. The use of at least one additional internal pool serum is recommended for internal quality control. There are also some commercial control sera available (e.g. Sigma A-6040 and A-7040, respectively). Due to methodological differences in analyzing the control sera, the values reported on the corresponding data sheets must not necessarily correspond to the data being received with the BÜHLMANN ACE REA assay.

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Intra-Assay Precision: 2.2%. The intra-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values from four different serum samples in a single run. The values are presented in Table 12.

Inter-Assay Precision: 4.3%. The inter-assay precision was calculated from four different serum samples and two controls tested in 20 different runs. The values are presented in Table 13.

Dilution Linearity: 115%. Three human serum samples have been diluted with Zero Calibrator (ACE free serum) and subsequently assayed according to the assay procedure. The values are presented in Table 14.

Analytical Sensitivity: 0.4 U/l. Twenty Zero Calibrators in duplicates have been determined according to the assay procedure. The mean and the standard deviation (SD) were calculated from the cpm values obtained. To determine the minimal detectable ACE activity the addition of 2 SD to the mean results in a cpm value which than has been calculated as described in "Results"

Functional Sensitivity: 2.0 U/l. Five different serum samples with mean values between 1.8 and 16.3 U/l were each tested 10 times in duplicates as an intra-assay. The coefficient of variation (CV) and the mean values were calculated for each sample. The functional least detectable dose (FLDD) was observed at a CV of 10%

Specificity: A serum sample of defined ACE activity has been inhibited with different dilution of angiotensin I (3.8×10^{-3} - 3.8×10^{-7} mol/l) and EDTA (1.3×10^{-3} - 1.3×10^{-7} mol/l) for two hours at $18-28^\circ\text{C}$ and subsequently measured according to the assay procedure. The results are presented in Table 15.

EXPECTED VALUES AND CUT-OFF

The serum ACE activity strongly depends on the genotype of the patients investigated (12). Therefore, reference values depend on the genetic pattern of the donors and differences can be explained by the frequency of the three genotypes within group of donors on investigation.

From a group of 80 adult (age 20-70 years) normal blood donors from Switzerland, a normal reference range (2.5-97.5th Percentile) has been determined to be (cf. Table 16):

26-60 U/l

In a study with 50 sarcoidosis patients, serum ACE levels were within a range of 45-135 U/l (2).

Serum ACE levels in individuals under 18 years of age are substantially higher and more variable than in adults. Those should be established separately (3).

METHOD COMPARISON

80 sera from apparently healthy donors (see above) were analyzed with the three different assays from BÜHLMANN AG. The results from ACE direct REA, ACE colorimetric (KK-ACE) and ACE kinetic (KK-ACK) were correlated:

ACE direct = $0.65 \times \text{ACE colorimetric} + 13.7 \text{ U/l}$;
 $r = 0.94$; $r^2 = 0.89$

ACE direct = $0.75 \times \text{ACE kinetic} + 6.9 \text{ U/l}$;
 $r = 0.96$; $r^2 = 0.93$

DEUTSCH

ANWENDUNGSZWECK

Der Radioenzym ACE REA von BÜHLMANN wird für die direkte und quantitative Erfassung der Aktivität von Angiotensin konvertierendem Enzym (angiotensin converting enzyme, ACE) in Serum gebraucht (1-3).

PRINZIP DER METHODE

Angiotensin konvertierendes Enzym (ACE) katalysiert die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II. Das Enzym katalysiert ebenso die Spaltung von einem synthetischen Substrat, ³H-Hippuryl-Glycyl-Glycin, in ³H-Hippursäure und Glycyl-Glycine Dipeptid (4). Nach einer Ansäuerung wird die tritierte Hippursäure mittels einer Extraktion unter Einwirkung eines Szintillations-Cocktails von nicht-reaktivem Substrat getrennt und in einem beta-Zähler erfaßt.

Dieser Test ist an der colorimetrischen ACE Methode (BÜHLMANN, Art.-Nr. KK-ACE) gemäss den Angaben in Literaturreferenzen 5 and 6 standardisiert.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenzien	Inhalt	Art.-Nr.	Rekonstitution
Tracer ³ H-hippuryl-Glycyl-Glycine in HEPES Puffer (pH=8.0)	1 Flasche 11 ml	B-ACD-TR	gebrauchsfertig
Kalibrator Lyophilisiertes Humanserum	1 Flasche	B-ACD-CA	mit 1 ml deionisiertem Wasser lösen, sorgfältig schwenken
Null Kalibrator Lyophilisiertes Human- serum, ohne ACE Aktivität	1 Flasche	B-ACD-OCA	mit 1 ml deionisiertem Wasser lösen, sorgfältig schwenken
Kontrolle Normal /Hoch¹⁾ lyophilisiertes Human- serum	2 Flaschen	B-ACD- CONSET	mit 1 ml deionisiertem Wasser lösen, vor Gebrauch gut mischen
HCl Lösung 1N Salzsäure	1 Flasche 6 ml	B-ACD-HA	gebrauchsfertig
Szintillations Pulver²⁾ vorgemischt	1 Flasche	B-ACD-SCP	Mit 120 ml Xylene und 40 ml Ethylacetat, gut mischen

Tabelle 3

¹⁾ Lot spezifische ACE Aktivität in Humanserum Matrix. Vgl. zusätzliches QC-Datenblatt für genaue Konzentrationen.

²⁾ An Stelle von Szintillations Pulver kann **Xylene-freies** Ultima Gold F (PerkinElmer; # 6013179) verwendet werden. Mische 120 ml Ultima Gold F mit 40 ml Ethylacetat. In brauner Flasche bei 18-28°C bis zu 6 Monaten lagerbar.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Bei 2-8°C lagern. Zu verwenden bis Verfallsdatum. HCl Lösung und Szintillations Pulver können bei 18-28°C gelagert werden.	
Geöffnete / rekonstituierte Reagenzien	
Tracer	Bei 2-8°C stabil, bis zu Verfallsdatum haltbar
Kalibrator	Während 2 Monaten bei -20° stabil
Null Kalibrator	
Kontrollen	
HCl Lösung	Bei 18-28°C stabil, bis zu Verfallsdatum gebrauchen
Szintillations Pulver	Bei 18-28°C während 6 Monaten stabil, wenn in brauner Flasche gelagert

Table 4

WARNUNG UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Radioaktives Material: Die RK-ACD Testpackung enthält radioaktives Material, welches eine Strahlung von weniger als 188 kBq (5.0 µCi) an Tritium (³H) abgibt.

Der Erwerb sowie der Gebrauch von radioaktivem Material muß entsprechend den landesspezifischen Bestimmungen erfolgen.

Wir empfehlen dringend, sich über die lokalen Bestimmungen Ihres Landes betreffend der Vorsichtsmassnahmen beim

Gebrauch und der Entsorgung von Kitreagenzien, radioaktivem Material und Patientenproben zu informieren.

Reagenzien mit Humanmaterial: Der Kalibrator (B-ACD-CA), Null-Kalibrator (B-ACD-OCA), sowie die Kontrollen (B-ACD-CONSET) enthalten Komponenten menschlicher Herkunft. Jedes einzelne Spender Serum wurde durch eine FDA genehmigte 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 diese Kit Komponenten, sowie die Patientenproben als potentiell infektiös betrachtet werden.* Alle Produkte welche humanes Material enthalten müssen mit größter Vorsicht und nach den aktuellen Vorgaben der Guten Labor Praxis verarbeitet werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 10 µl, 50 µl, 100 µl and 1000 µl Präzisionspipetten mit Einwegspitzen.
- 2 ml Polypropylen Einwegröhrchen mit Schraubverschluss (Minitubes von Sarstedt, Art.-Nr. 72.693).
- Zylinder und braune Glasflasche zur Herstellung von Szintillations-Cocktail.
- deionisiertes oder doppelt destilliertes Wasser.
- Xylene p.a. (z. Bsp. Merck Nr. 8681) oder Ultima Gold F Szintillations Lösung (PerkinElmer Nr. 6013179).
- Ethylazetat p.a. (z. Bsp. Merck no. 9623)
- 10 ml Szintillations-Röhrchen.
- Vortex Schüttler.
- Wasserbad, einstellbar auf 37°C.
- Beta Counter.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Serum: EDTA hemmt die ACE Aktivität. Deshalb dürfen zur Bestimmung der ACE Aktivität nur Serum Proben eingesetzt werden.

Ausreichende Blutmenge (mindestens 1 ml) durch Venenpunktion in Plastispritze oder Blutentnahmeröhrchen ohne Antikoagulanzen entnehmen. Blut während 2-3 Stunden bei 18-28°C stehen lassen, dann bei 2-8°C zentrifugieren und Serum gewinnen. Serum Proben bei -20°C oder tiefer einfrieren, wenn sie länger als 5 Tage nicht getestet werden. In sterilem Serum bleibt die ACE Aktivität bis zu 30 Tagen bei 2-8°C und bis bei -20°C oder tiefer bis zu 6 Monaten erhalten.

Lipämische Seren interferieren im ACE REA Test nicht.

Hinweis: Einige Publikationen (z.B. 7,8) weisen in Patienten unter Captopril-Medikation auf eine Zunahme der ACE Aktivität in Abhängigkeit der Lagerzeit hin. Um einer Verminderung der ACE-Hemmung vorzubeugen wird empfohlen, Seren von Captopril behandelten Patienten innerhalb von 4 Stunden nach Blutentnahme im Test anzusetzen. Diese Seren können bis zu 12 Tagen bei -70°C (Trockeneis) gelagert werden. Dieses Phänomen wurde in Patienten in Medikation mit anderen ACE Hemmern (z.B. Enalapril nicht beobachtet (8).

Andere Proben: Extraktionsschemata für Urin und Gewebe Proben sind in der Literatur beschrieben (9-11).

ARBEITSANLEITUNG

1. Sechs Röhrchen für Null Kalibrator, Kalibrator und Kontroll Serum und zusätzliche Röhrchen für jede Patienten Probe jeweils im Duplikat vorbereiten.

Hinweis: Röhrchen und Deckel nicht beschriften. Die Zähleffizienz wird durch Markierungen auf Deckel und Röhrchen vermindert! (Quenching).

2. 10 µl Null Kalibrator, Kalibrator, Kontrollen und Patienten Probe(n) in die entsprechenden Röhrchen geben.
3. 100 µl tritiiertes Substrat (Tracer) zu jedem Miniröhrchen dazugeben. Alle Röhrchen während mindestens 5 Sekunden schütteln.
4. Alle Röhrchen während 60 ± 5 min bei 37°C (in einem Wasserbad) inkubieren.
5. Jedem Röhrchen 50 µl 1 N Salzsäure Lösung zugeben, vortexen.
6. 1.5 ml Szintillations Cocktail in alle Röhrchen zugeben. Deckel aufschrauben und 5 Sekunden vortexen

Hinweis: Röhrchen vor Zählvorgang mindestens 1 Stunde stehen lassen.

7. jedes Röhrchen in Scintillations Röhrchen stellen und während 5 Minuten im Beta Counter zählen.

RESULTATE

Berechnung: cpm (Zähleinheiten pro Minute) in jedem Röhrchen (Null Kalibrator, Kalibrator, Kontrollen, Proben) bestimmen und Durchschnittswert für jedes Röhrchenpaar berechnen. Gemittelten cpm-Wert des Null Kalibrators von gemitteltem cpm-Wert jedes Röhrchenpaares subtrahieren:

Nettowert = cpm (Mittelwert) – cpm (Nullkalibrator)

Die Berechnung der ACE Aktivität der Proben oder Kontrollen erfolgt durch Division des Nettowertes der Proben oder Kontrollen mit dem Nettowert des Kalibrators und anschliessender Multiplikation mit der ACE Aktivität des Kalibrators, A_S , welche auf der Etikette der Kalibratorflasche angegeben ist:

$$\text{ACE Aktivität} = \frac{\text{netto Zählung der Proben}}{\text{netto Zählung des Kalibrators}} \times A_S$$

Definition: eine Unit ACE Aktivität ist als die Enzym Menge definiert, welche gemessen mittels der colorimetrischen ACE Methode benötigt wird, um ein µmol Hippursäure pro Minute und pro Liter Serum bei 37°C freizusetzen:

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

Standardisierung: Die Werte, welche mit dieser Testmethode erzielt werden, sind identisch mit den Werten, welche mit der BÜHLMANN colorimetrischen Methode (Art.-No. KK-ACE) erhalten werden.

Diese Standardisierung hat zum Vorteil, dass die individuellen Werte in der colorimetrischen (KK-ACE), kinetischen (KK-ACK) oder radioenzymatischen Methode (RK-ACD) direkt miteinander verglichen werden können.

QUALITÄTS KONTROLLE

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

Die Reproduzierbarkeit der Eichkurvenparameter und der Kontrollwerte sollte innerhalb des etablierten Erwartungs-

bereiches liegen. Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem zusätzlichen QC-Datenblatt angegeben. Die Messung von mindestens einem internen Serum Pool ist zur internen Qualitätskontrolle empfohlen. Kontrollseren sind auch kommerziell erhältlich (z. Bsp. Sigma A-6040 und A-7040). Kontroll Seren werden mit unterschiedlichen Methoden analysiert. Demnach stimmen die Werte auf den jeweiligen Daten Blättern nicht zwingenderweise mit im ACE REA ermittelten Werten übereinstimmen.

Falls die Präzision des Testes nicht mit dem etablierten Erwartungsbereich übereinstimmt und wiederholte Messungen ein technisches Problem ausschliessen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipettierung, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, ii) Verfallsdaten der Reagenzien, iii) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, iv) Wasserreinheit.

LEISTUNGSMERKMALE

Intra-Assay Präzision: 2.2%. Die Intra-assay Präzision wurde aus den Resultaten von 20 Wertepaaren von vier verschiedenen Serumproben in gleichen Testansatz ermittelt. Die Resultate sind in Table 12 dargestellt.

Inter-Assay Präzision: 4.3%. Die Inter-Assay Präzision wurde aus den Resultaten von vier verschiedenen Serumproben, sowie zwei Kontrollen in 20 verschiedenen Testansätzen ermittelt. Die Resultate sind in Table 13 dargestellt.

Verdünnungs-Linearität: 115%. Drei Serumproben wurden mit Null Kalibrator (ACE freiem Serum) verdünnt und entsprechend der Arbeitsanleitung in einem Ansatz getestet. Die Werte sind in Table 14 dargestellt.

Analytische Sensitivität: 0.4 U/l. Zwanzig Null Kalibratoren wurden entsprechend der Arbeitsanleitung im Doppel gemessen. Der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) wurden aus den erhaltenen cpm Werten berechnet. Um die minimale nachweisbare ACE Aktivität zu bestimmen wurden 2SD zum erhaltenen Mittelwert (cpm) dazugezählt, und danach entsprechend den Angaben in „Resultate“ berechnet.

Funktionelle Sensitivität: 2.0 U/l. Fünf verschiedene Serumproben, mit Mittelwerten zwischen 1.8 und 16.3 U/l wurden wie im Intra-Assay je 10fach im Doppel gemessen. Der Variationskoeffizient (CV) und der Mittelwert wurden für jede Probe berechnet. Die funktionell tiefste nachweisbare Menge (FLDD) wurde bei einem CV von 10% abgelesen.

Spezifität: Eine Serum Probe mit definierter ACE Aktivität wurde mit verschiedenen Verünnungen von Angiotensin I (3.8×10^{-3} - 3.8×10^{-7} mol/l) oder EDTA (1.3×10^{-3} - 1.3×10^{-7} mol/l) für 2 Stunden bei 18 - 28°C inhibiert und anschliessend gemessen. Die Resultate sind in Table 15 dargestellt.

NORMAL- UND GRENZWERTE

Die Serum ACE Aktivität ist stark abhängig vom Genotyp der untersuchten Patienten (12). Aus diesem Grunde sind die ermittelten Referenzwerte abhängig vom genetischen Muster der untersuchten Spender und Unterschiede können durch die Häufigkeit der drei Genotypen in der untersuchten Spendergruppe erklärt werden.

Mittels einer Gruppe von **80 erwachsenen Normalblutspendern** aus der Schweiz, wurde ein Referenzbereich (2.5-97.5 Percentile) bestimmt (siehe Table 16):

26 – 60 U/l

In einer Studie wurden Serum Proben von 50 Sarcoidosis Patienten bestimmt und lagen im Bereich von 45 – 135 U/l (2).

Serum ACE Werte von Personen unter 18 Jahren sind bedeutend höher und zeigen eine höhere Schwankungsbreite als bei Erwachsenen und sollten speziell bestimmt werden (3).

METHODEN VERGLEICH

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

ACE direct = 0.65 * ACE colorimetric + 13.7 U/l;
r = 0.94; r² = 0.89

ACE direct = 0.75 * ACE kinetic + 6.9 U/l;
r = 0.96; r² = 0.93

FRANÇAIS

UTILISATION

La trousse BÜHLMANN ACE radio-enzymatique (REA) est destinée au dosage quantitatif direct de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans le sérum (1-3).

PRINCIPE DU DOSAGE

L'enzyme de Conversion de l'Angiotensine (ACE) catalyse la conversion de l'Angiotensine I en Angiotensine II. Cet enzyme est également le médiateur du clivage d'un substrat synthétique, le ³H-hippuryl-glycyl-glycine en acide ³H-hippurique et en un dipeptide glycyl-glycine (4). Après acidification, l'acide ³H-hippurique est séparé du substrat n'ayant pas réagi au moyen d'une extraction dans un cocktail de scintillation et mesuré dans un compteur bêta. Cette trousse a été standardisée par rapport à la trousse ACE Colorimétrique BÜHLMANN (code: KK-ACE) et est conforme aux méthodes de références citées en annexe.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Traceur ³ H-hippuryl-glycyl-glycine dans un tampon HEPES (pH=8.0)	1 flacon 11 ml	B-ACD-TR	Prêt à l'emploi
Calibrateur ¹⁾ Sérum humain lyophilisé	1 flacon	B-ACD-CA	Reconstituer avec 1 ml d'eau déionisée puis agiter doucement afin d'homogénéiser
Calibrateur zéro Sérum humain lyophilisé et exempt de toute activité ACE	1 flacon	B-ACD-0CA	Reconstituer avec 1 ml d'eau déionisée puis agiter doucement afin d'homogénéiser
Contrôle Normal /Elevé ¹⁾ Sérum humain lyophilisé	2 flacons	B-ACD-CONSET	Reconstituer avec 1 ml d'eau déionisée puis bien homogénéiser
Solution de HCl acide chlorhydrique 1N	1 flacon 6 ml	B-ACD-HA	Prêt à l'emploi
Poudre de scintillation ³⁾ Pré mélangée	1 flacon	B-ACD-SCP	Dissoudre avec 120 ml de xylène et 40 ml d'acétate d'éthyle, bien mélanger.

Table 5

¹⁾ Activité ACE spécifique à chaque lot (matrice sérique humaine). Merci de vous référer au document de QC pour les concentrations précises.

²⁾ Il est possible d'utiliser le liquide de scintillation suivant, en remplacement de la poudre à reconstituer avec du xylène : Ultima Gold F (Canberra Packard no. 6013179). Mélanger 120 ml de Ultima Gold F avec 40 ml d'acétate d'éthyle afin d'obtenir le liquide de scintillation. A conserver dans une bouteille de verre brun jusqu'à 6 mois à une température de 18-28°C.

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs fermés non reconstitués	
A conserver à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette.	
Réactifs reconstitués	
Traceur	Stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette
Calibrateur	Stables durant 2 mois à -20°C
Calibrateur zéro	
Contrôles	
Solution de HCl	Stable à 18-28°C jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette
Poudre de scintillation	Stable durant 6 mois à 18-28°C si elle est conservée dans une bouteille de verre brun.

Table 6

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

Cette trousse contient du matériel radioactif n'excédant pas 188 kBq (5.0 µCi) de tritium (³H). La réception, l'acquisition, la possession, l'utilisation et le transfert de ce type de matériel doit se faire en accord avec la réglementation de chaque pays. Nous vous conseillons de prendre contact avec les autorités locales et de suivre scrupuleusement les

consignes relatives à la manipulation de matériel radioactif et à la gestion des déchets radioactifs et biologiques (échantillons de patients).

Réactifs contenant du matériel d'origine humaine: le calibrateur (B-ACD-CA), le calibrateur zéro (B-ACD-CA0) ainsi que les contrôles (B-ACD-CONSET) de cette trousse contiennent des composants d'origine humaine. Chaque unité de sérum de donneur utilisée dans la préparation des réactifs de la trousse a été testée par une méthode approuvée par la FDA et a été séronégative pour l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg) et pour les anticorps anti-VIH 1/2. Cependant, bien que ces méthodes soient très fiables, il ne peut être garanti que ce matériel ne puisse transmettre une hépatite B ou le SIDA.

En conséquence, tous les échantillons et les réactifs doivent être manipulés comme s'ils étaient infectieux. Tous les produits contenant du matériel d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en respectant les précautions d'usage.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision de 10 µl, 50 µl, 100 µl et 1000 µl avec pointes jetables
- Tubes de 2 ml en polypropylène avec bouchons à visser pour l'essai (nous conseillons les Minutubes Sarstedt no. 72.693)
- Epruvettes graduées et bouteilles de verre brun pour la préparation du cocktail de scintillation.
- Eau doublement distillée ou déionisée
- Xylène p.a. (par exemple Merck no. 8681) ou, alternativement, Ultima Gold F liquide de scintillation (Canberra Packard no. 6013179)
- Acétate d'éthyle p.a. (par exemple Merck no. 9623)
- Tubes de scintillation de 10 ml
- Vortex
- Bain Marie à 37°C
- Compteur bêta.

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Sérum : 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 1 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 2-8°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.

Les échantillons lipémiques peuvent être dosés (aucune interférence n'a été constatée)

Remarque: Beaucoup d'auteurs rapportent que l'activité de l'ACE chez les patients sous Captopril augmente en fonction du temps de conservation des échantillons (7,8). Afin d'éviter toute perte d'inhibition de l'ACE, les échantillons sériques des patients sous Captopril devraient être analysés dans les 4 heures qui suivent le prélèvement. En cas de besoin, ces échantillons peuvent être conservés à -70°C sur une période de 12 jours. Ce phénomène n'est pas observé chez les patients recevant d'autres inhibiteurs de l'ACE comme l'Enalapril (8).

Autres échantillons : Les protocoles d'extraction pour les échantillons tissulaires et urinaires sont décrits dans les références (9-11).

PROTOCOLE DE DOSAGE

1. Préparer 6 minitubes en double pour le blanc (calibrateur zéro), le calibrateur et le contrôle. Préparer autant de minitubes en double qu'il y a d'échantillons à analyser.

Remarque: Ne marquer ni les tubes, ni les bouchons. Toute inscription a une influence sur le comptage !

2. Transférer respectivement 10 µl du calibrateur "zéro", du calibrateur et du contrôle dans les minitubes correspondants.
3. Ajouter 100 µl de substrat tritié à chaque minitube. Vortexer tous les tubes durant au moins 5 secondes.
4. Incuber tous les tubes durant 60 minutes ± 5 minutes dans un bain Marie à 37°C.
5. Ajouter 50 µl d'HCl 1 N à chaque minitube. Vortexer.
6. Pipeter 1.5 ml de cocktail de scintillation dans les minitubes. Visser soigneusement les bouchons puis vortexer durant 5 secondes.

Remarque: Laisser reposer les minitubes durant au moins 1 heure avant de procéder au comptage.

7. Placer chaque minitube dans un tube de scintillation puis compter durant 5 minutes dans le compteur bêta.

RESULTATS

Calcul: Enregistrer les cpm de tous les tubes (blanc, calibrateur, contrôles et échantillons) puis calculer la moyenne des cpm pour chaque paire de tubes :

$\text{Cpm nets} = \text{moyenne des cpm} - \text{moyenne des cpm blanc}$

Calculer l'activité ACE correspondante de l'échantillon ou du contrôle en divisant les cpm nets de l'échantillon ou du contrôle par les cpm nets du calibrateur puis en les multipliant par l'activité ACE du calibre, A_s , (indiquée sur le flacon du calibre):

$$\text{Activité ACE} = \frac{\text{cpm nets patient}}{\text{cpm nets calibrateur}} \times A_s$$

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

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

Standardisation: les valeurs obtenues par ce dosage sont identiques à celles obtenues avec la trousse standard ACE colorimétrique BÜHLMANN LABORATORIES AG (code: KK-ACE).

Cette standardisation permet de comparer directement les résultats obtenus par les différentes méthodes : colorimétrique (KK-ACE), cinétique (KK-ACK) et/ou radio-enzymatique (RK-ACD).

CONTROLE QUALITE

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

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage ainsi que des valeurs des contrôles devraient être comprises dans le domaine des valeurs attendues établies par chaque laboratoire. Les limites de confiance des contrôles sont spécifiques à chaque lot et sont imprimées sur la fiche de QC ajoutée au kit.

L'utilisation d'un pool sérique additionnel est recommandé en tant que contrôle qualité interne (par exemple Sigma A-6040 et A-7040, respectivement). En raison des différences méthodologiques d'analyse des contrôles, les valeurs reportées ne sont pas nécessairement identiques à celles obtenues avec la trousse BÜHLMANN ACE REA.

Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de contrôle de température et de temps, ii) date de péremption des réactifs, iii) conditions de stockage et d'incubation, iv) pureté de l'eau.

PERFORMANCES

Précision Intra-essai: 2.2%. La précision intra-essai a été calculée à partir des mesures de 4 échantillons sériques analysés 20 fois en double au cours d'un même essai. Les résultats obtenus se trouvent en Table 12.

Précision Inter-essai: 4.3%. La précision inter-essai a été calculée à partir des mesures de 4 échantillons sériques différents et deux contrôles analysés respectivement au cours de 20 essais différents. Les résultats obtenus se trouvent en Table 13.

Linéarité de la dilution: 115%. Trois échantillons sériques furent dilués avec un sérum exempt d'ACE (calibrateur "zéro") puis analysés d'après le protocole standard. Les résultats obtenus se trouvent en Table 14.

Sensibilité analytique: 0.4 U/l. Vingt doubles du calibrateur zéro ont été dosés lors d'un seul et même essai. La moyenne et l'écart type des valeurs en cpm ont été calculés. La dose minimale détectable d'activité ACE a été obtenue en additionnant 2 écarts types à la moyenne des cpm du calibrateur zéro puis les unités d'ACE correspondantes ont été calculées comme le décrit la partie "Résultats".

Functional Sensitivity: 2.0 U/l. Cinq échantillons de sérum ayant des valeurs moyennes comprises entre 1.8 et 16.3 unités d'ACE ont été dosés 10 fois en double comme un intra-essai. Le coefficient de variation (CV) et les valeurs moyennes ont été calculés pour chaque échantillon. La dose minimale détectable fonctionnelle (FLDD) a été observée à un coefficient de variation de 10%.

Spécificité: Un échantillon sérique ayant une activité ACE définie a été inhibé par différentes dilutions d'angiotensine I (3.8×10^{-3} - 3.8×10^{-7} mol/l) et d'EDTA (1.3×10^{-3} - 1.3×10^{-7} mol/l) pendant deux heures à 18-28°C puis dosé selon le protocole expérimental. Les résultats sont présentés dans la Table 15.

VALEURS ATTENDUES ET CUT-OFF

L'activité de l'ACE sérique dépend fortement du génotype du patient (12). Par conséquent, les valeurs de référence dépendent du modèle génétique du donneur et des différences peuvent être expliquées par la fréquence des trois génotypes dans le groupe de donneurs.

Au cours d'une étude basée sur un groupe de **80 donneurs de sang adultes** (20-70 ans) résidant en Suisse, le domaine de référence (2.5-97.5^{ème} percentile) a été définie comme étant (cf. Table 16):

26 – 60 U/l

Les échantillons sériques 50 patients atteints de sarcoïdose présentèrent des valeurs comprises entre 45 et 135 unités (2)

Les valeurs sériques chez les patients âgés de moins de 18 ans sont généralement plus élevées et présentent des variations plus importantes. Elles devront être définies préalablement séparément. (3).

COMPARAISON DE METHODES

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

ACE direct = $0.65 * \text{ACE colorimetric} + 13.7 \text{ U/l}$;
 $r = 0.94$; $r^2 = 0.89$

ACE direct = $0.75 * \text{ACE kinetic} + 6.9 \text{ U/l}$;
 $r = 0.96$; $r^2 = 0.93$

USO

Il dosaggio radioenzimatico BÜHLMANN ACE (REA) è designato per la determinazione diretta e quantitativa dell'attività dell'enzima che converte l'angiotensina (ACE) nel siero (1-3).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

L'enzima che converte l'angiotensina (ACE) catalizza la conversione dell'angiotensina I in angiotensina II. L'enzima media anche il clivaggio del substrato sintetico, ³H-Ippuril-glicil-glicina, in ³H-acido ippurico ed in glicol-glicina dipeptide (4). Dopo acidificazione, l'acido ippurico triziato viene separato dal substrato non reattivo attraverso estrazione con un cocktail di scintillazione e misurato in un beta counter. Questo test è stato standardizzato con il kit BÜHLMANN ACE colorimetrico (codice: KK-ACE) secondo il metodo descritto in bibliografia 5 e 6.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Tracciante ³ H-ippuril-glicil-glicina (pH=8.0)	1 flacone 11 ml	B-ACD-TR	Pronto all'uso
Calibratore ¹⁾ Siero liofilo umano	1 flacone	B-ACD-CA	Ricostituire con 1 ml di acqua deionizzata e scuotere delicatamente per dissolvere.
Calibratore zero Siero umano liofilo privo di attività ACE	1 flacone	B-ACD-0CA	Ricostituire con 1 ml di acqua deionizzata e scuotere delicatamente per dissolvere.
Controllo normale /alto ¹⁾ Siero umano liofilo	2 flaconi	B-ACD-CONSET	Ricostituire con 1 ml di acqua deionizzata e scuotere delicatamente per dissolvere.
Soluzione HCl 1N di acido idrocloridrico	1 flacone 6 ml	B-ACD-HA	Pronto all'uso
Polvere di scintillazione ²⁾ Premescolata	1 flacone	B-ACD-SCP	Dissolvere con 120 ml di xilene e 40 ml di acetato di etile, mescolare bene.

Table 7

¹⁾ Attività ACE lotto specifica in una matrice di siero umano. Fare riferimento ai fogli di QC per le concentrazioni esatte.

²⁾ Il seguente fluido per scintillazione **non-xilene** costituisce un sostituto accettabile della polvere di scintillazione: Ultima Gold F (PerkinElmer no. 6013179). Mescolare 120 ml di Ultima Gold F con 40 ml di acetato di etile per ottenere il reagente di scintillazione. Conservare in flaconi di vetro marroni fino a 6 mesi a 18-28°C.

CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti non utilizzati	
Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. La soluzione HCl e la polvere per scintillazione possono essere conservate a 18-28°C.	
Reagenti aperti/ ricostituiti	
Tracciante	Stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta
Calibratore	Stabile per 2 mesi a -20°C
Calibratore zero	
Controlli	
Soluzione HCl	Stabile a 18-28°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta
Polvere di scintillazione	Stabile per 6 mesi a 18-28°C se conservata in flaconi di vetro marroni

Table 8

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Il kit contiene materiale radioattivo che non eccede i 188 kBq (5.0 µCi) di trizio (³H). Il ricevimento, acquisizione, possesso, utilizzo e trasferimento sono soggetti alle regolamentazioni locali. Per quanto riguarda le precauzioni nella manipolazione ed eliminazione dei reagenti, del materiale radioattivo, dei rifiuti radioattivi e dei campioni dei pazienti, consigliamo di fare

riferimento alle regolamentazioni locali del proprio paese di appartenenza.

Reagenti che Contengono Materiale di Origine Umana: Il calibratore (B-ACD-CA) il calibratore zero (B-ACD-CA0) ed i controlli (B-ACD-CONSET) di questo kit contengono componenti di origine umana. Ciascun campione di siero utilizzato nella preparazione dei componenti del kit è stato testato con un metodo approvato dall'FDA e trovato negativo per l'antigene di superficie dell'HBV, per gli anticorpi anti-HCV ed anti-HIV1/2. Benché questi metodi siano altamente accurati, non esiste nessuna garanzia che questo materiale non trasmetta l'epatite o l'AIDS. *Quindi, tutti i campioni dei pazienti ed i componenti del kit devono essere manipolati come se potessero trasmettere infezioni.* Tutti i prodotti contengono materiale di origine umana secondo buone pratiche di laboratorio utilizzando idonee precauzioni.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso da 10 µl, 50 µl, 100 µl e 1000 µl.
- Provette di polipropilene da 2 ml con tappo a vite (preferibilmente Sarstedt Miniprovette no. 72.693).
- Cilindri e flaconi di vetro marroni per la preparazione del cocktail di scintillazione.
- Acqua distillata o deionizzata due volte.
- Xilene p.a. (e.g. Merck no. 8681) o, in alternativa, fluido di scintillazione Ultima Gold F (PerkinElmer no. 6013179).
- Acetato di etile p.a. (e.g. Merck no. 9623)
- Flaconi per scintillazione da 10 ml.
- Vortex mixer.
- Bagno termostato a 37°C.
- Beta counter.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Siero: Poiché l'EDTA inibisce l'attività dell'ACE, utilizzare solo campioni di siero per la determinazione dell'attività dell'ACE. Prelevare sangue a sufficienza (almeno 1 ml) in siringhe di plastica o butterfly senza anticoagulanti. Lasciar riposare il sangue per 2-3 ore a 18-28°C, quindi centrifugarlo a 2-8°C e prelevare il siero. Congelare i campioni di siero a -20°C o a temperature inferiori se non dosato entro 5 giorni. L'attività ACE nel siero sterile è stabile fino a 30 giorni a 2-8°C e 6 mesi a -20°C o temperature più basse.

Sieri lipemici non interferiscono con il dosaggio ACE REA.

Nota: Molti autori (e.g. 7,8) hanno riferito che l'attività dall'ACE in pazienti sottoposti a terapia con captopril aumenta in funzione della durata della conservazione.

Per evitare qualsiasi perdita nell'inibizione dell'ACE, i sieri dei pazienti sottoposti a captopril devono essere dosati entro 4 ore dal prelievo del sangue. Per conservazioni fino a 12 giorni, questi campioni devono essere tenuti a -70°C (ghiaccio secco). Questo fenomeno non si verifica in sieri di pazienti trattati con altri inibitori dell'ACE quali l'enalapril (8).

Altri campioni: Le procedure di estrazione per l'urina e per i campioni di tessuto sono descritte in bibliografia 9-11.

PROCEDURA DEL DOSAGGIO

1. Preparare 6 miniprovette in duplicato per il bianco (calibratore zero), il calibratore ed il siero di controllo. Preparare altre provette in duplicato per ciascun campione.

Nota: Non etichettare le provette o i tappi. Qualsiasi segno ridurrà l'efficienza della conta!

2. Dispensare 10 µl del calibratore "zero", del calibratore, dei controlli e dei campioni, rispettivamente, nelle provette corrispondenti.

3. Aggiungere 100 µl di substrato triziato (tracciante) in ogni miniprovetta. Vortexare tutte le provette per almeno 5 secondi.
 4. Incubare tutte le provette per 60±5 minuti in un bagnetto ad acqua a 37°C.
 5. Aggiungere 50 µl di soluzione di acido idroclorico 1N ad ogni provetta. Vortexare.
 6. Dispensare 1.5 ml di cocktail di scintillazione nelle provette. Avvitare bene i tappini e vortexare per 5 secondi.
- Nota: Lasciare che le miniprovette riposino per almeno 1 ora prima della conta.**
7. Collocare ciascuna provetta nel flacone di scintillazione e contare per 5 minuti in un beta counter.

RISULTATI

Calcolo: Annotare i cpm per tutte le provette (bianco, calibratore, controlli, campioni) e calcolare i cpm medi per ciascuna coppia di provette. Sottrarre la media del dosaggio dalla media rispettiva di ciascuna coppia di provette:

Conte nette = cpm medi - cpm medi del bianco campione
Calcolare l'attività corrispondente ACE del campione e del controllo dividendo le conte nette del campione o del controllo per le conte nette del calibratore e moltiplicare per l'attività ACE del calibratore, A_s , (indicata sul flacone del calibratore):

$$\text{ACE activity} = \frac{\text{net counts for sample}}{\text{net counts for calibrator}} \times A_s$$

Definizione: Una unità di attività ACE è definita come quantitativo di enzima richiesto per rilasciare una µmole di acido ippurico al minuto ed per litro di siero a 37°C come determinato dal dosaggio colorimetrico:

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

Standardizzazione: I valori ottenuti con questo dosaggio sono identici ai valori ricevuti con il dosaggio colorimetrico standard della BÜHLMANN AG (codice: KK-ACE). La standardizzazione ha il vantaggio che i risultati ottenuti sia con il metodo colorimetrico (KK-ACE), che con il metodo cinetico (KK-ACK) o il metodo radioenzimatico (RK-ACD) sono tra loro paragonabili.

CONTROLLO DI QUALITÀ

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

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

Si consiglia l'utilizzo di almeno un altro pool di siero per il controllo di qualità interno. In commercio ci sono alcuni sieri di controllo disponibili (e.g. rispettivamente Sigma A-6040 e A-7040). A causa di differenze nelle metodologie nell'analisi dei sieri di controllo, i valori riportati nei corrispondenti fogli dei dati non devono necessariamente corrispondere ai dati contenuti nel dosaggio BÜHLMANN ACE REA.

Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude gli errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, controllo della temperatura

e dispositivi di rilevazione del tempo, ii) date di scadenza dei reagenti iii) condizioni di conservazione e di incubazione iv) purezza dell'acqua.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Precisione Intra-Dosaggio: 2.2%. la precisione intra-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori di quattro campioni diversi di siero in un'unica seduta. I valori sono riportati in Table 12.

Precisione Inter-Dosaggio: 4.3%. La precisione inter-dosaggio è stata calcolata da quattro campioni diversi di siero e due controlli testati in 20 sedute diverse. I valori sono riportati in Table 13.

Linearità di Diluizione: 115%. Tre campioni di siero umano sono stati diluiti con il calibratore zero (siero privo di ACE) e conseguentemente dosati secondo la procedura del dosaggio. I valori sono riportati in Table 14.

Sensibilità Analitica: 0.4 U/l. Sono stati determinati venti calibratori zero in duplicati secondo la procedura del dosaggio. La media e la deviazione standard (SD) sono state calcolate dai valori come ottenuti.

Per determinare l'attività ACE minima rilevabile l'aggiunta di 2 SD alla media produce un valore di cpm che è successivamente stato calcolato come descritto nei "Risultati".

Sensibilità Funzionale: 2.0 U/l. Cinque campioni di siero diversi con valori medi tra 1.8 e 16.3 unità sono stati testati ciascuno 10 volte in duplicati come intradosaggio. Il coefficiente di variazione (CV) ed i valori medi sono stati calcolati per ciascun campione. La dose funzionale minima rilevabile (FLDD) è stata osservata ad un CV del 10%.

Specificità: Un campione di siero con attività ACE definita è stato inibito con diverse diluizioni di angiotensina I (3.8×10^{-3} - 3.8×10^{-7} mol/l) e di EDTA (1.3×10^{-3} - 1.3×10^{-7} mol/l) per due ore a 18-28°C e successivamente misurato secondo la procedura del dosaggio. I risultati sono riportati in Table 15.

VALORI ATTESI E CUT-OFF

L'attività ACE del siero dipende fortemente dal genotipo dei pazienti studiati (12). Di conseguenza, i valori di riferimento dipendono dal codice genetico dei donatori e le differenze possono essere spiegate dalla frequenza dei tre genotipi nel gruppo dei donatori studiati.

Da un gruppo di **80 adulti** (età compresa tra 20-70) donatori di sangue Svizzeri, è stato determinato il range (2.5-97.5th Percentile) di normalità che risulta essere (cf. Table 16):

26 – 60 U/l

Campioni di siero provenienti da 50 pazienti con sarcoidosi erano entro un range di 45-135 unità (2).

I livelli di ACE nel siero in singoli individui al di sotto di 18 anni sono sostanzialmente più elevati e variabili di quelli degli adulti. Quelli devono essere stabiliti separatamente (3).

CONFRONTO DEI METODI

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

$$\text{ACE direct} = 0.65 * \text{ACE colorimetric} + 13.7 \text{ U/l};$$

$$r = 0.94; r^2 = 0.89$$

$$\text{ACE direct} = 0.75 * \text{ACE kinetic} + 6.9 \text{ U/l};$$

$$r = 0.96; r^2 = 0.93$$

USO PREVISTO

El radioenzimoinanálisis (REA) ACE (Angiotensin Converting Enzyme) de BÜHLMANN ha sido diseñado para la determinación directa y cuantitativa de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en suero (1-3).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

La enzima convertidora de angiotensina (ECA) cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II. La enzima posibilita también la fragmentación de un sustrato sintético, ³H-hipurilglicilglicina, en ³H-ácido hipúrico y en el dipéptido glicilglicina (4). Tras la acidificación, el ácido hipúrico tritado se separa del sustrato sin reaccionar mediante extracción con cóctel de centelleo y se mide en un contador beta.

Este ensayo se ha estandarizado con el kit colorimétrico ACE de BÜHLMANN (ref.: KK-ACE) según el método descrito en las referencias 5y 6.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Trazador 3H-hipurilglicilglicina en tampon HEPES (pH=8,0)	1 vial 11 ml	B-ACD-TR	Listo para usar
Calibrador¹⁾ suero humano liofilizado	1 vial	B-ACD-CA	Reconstituir con 1 ml de agua desionizada y agitar ligeramente hasta su disolución
Calibrador cero suero humano liofilizado sin ningún tipo de actividad ECA	1 vial	B-ACD-0CA	Reconstituir con 1 ml de agua desionizada y agitar ligeramente hasta su disolución
Control Normal / Alto¹⁾ suero humano liofilizado	2 viales	B-ACD-CONSET	Reconstituir con 1 ml de agua desionizada y mezclar bien antes de usar
Solución HCl Ácido clorhídrico 1N	1 vial 6 ml	B-ACD-HA	Listo para usar
Polvo de centelleo²⁾ Premezclado	1 vial	B-ACD-SCP	Disolver con 120 ml de xileno y 40 ml de acetato de etilo, mezclar bien

Tabla 9

¹⁾ Actividad ECA en matriz de suero humano específica del lote. Consulte la hoja de datos de control de calidad adicional para las concentraciones exactas.

²⁾ El siguiente líquido de centelleo **sin xileno** es un sustituto aceptable del polvo de centelleo: Ultima Gold F (PerkinElmer ref. 6013179). Mezcle 120 ml de Ultima Gold F con 40 ml de acetato de etilo para obtener el reactivo de centelleo. Almacénalo en una botella de vidrio marrón hasta 6 meses a 18-28°C.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en las etiquetas. La solución HCl y el polvo de centelleo pueden almacenarse a 18-28°C.	
Reactivos abiertos / reconstituídos	
Trazador	Estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta
Calibrador	Estable durante 2 meses a -20°C.
Calibrador cero	
Controles	
Solución HCl	Estable a 18-28°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta
Polvo de centelleo	Estable durante 6 meses a 18-28°C si se almacena en botella de vidrio marrón

Tabla 10

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este kit contiene material radiactivo que no supera 188 kBq (5.0 µCi) de tritio (³H). La recepción, la adquisición, la posesión, el uso y la cesión están sujetos a las normativas locales. Respecto a las precauciones adecuadas para la manipulación y eliminación de los reactivos del kit, material radiactivo, desechos radiactivos y especímenes de los

pacientes, recomendamos encarecidamente que consulte primero las normativas locales especiales de su país.

Reactivos que contienen material de origen humano: El calibrador (B-ACD-CA), el calibrador cero (B-ACD-CA0) y los controles (B-ACD-CONSET) de este kit contienen componentes de origen humano. Todos los sueros utilizados en la preparación de 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 exactos, 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 de 10 µl, 50 µl, 100 µl y 1000 µl con puntas desechables.
- Tubos de polipropileno de 2 ml desechables con tapón a rosca hermético para el ensayo (preferiblemente minitubos Sarstedt ref. 72.693).
- Cilindros y botella de vidrio marrón necesarios para la preparación del cóctel de centelleo.
- Agua bidestilada o desionizada.
- Xileno p.a. (p. ej. Merck ref. 8681) o bien, líquido de centelleo Ultima Gold F (PerkinElmer ref. 6013179).
- Acetato de etilo p.a. (p.ej. Merck ref. 9623).
- Viales de centelleo de 10 ml.
- Mezclador vórtex.
- Baño de agua ajustado a 37°C.
- Contador beta.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Suero: Dado que el **EDTA inhibe** la actividad de la ECA, sólo se debe utilizar muestras de suero para la determinación de la actividad de la ECA:

Recoja sangre suficiente (1 ml como mínimo) por venipunción en una jeringa de plástico o en un tubo de venipunción sin ningún tipo de anticoagulante. Deje la sangre en reposo durante 2-3 horas a 18-28°C. Después centrifugue a 2-8°C y recoja el suero. Congele la muestra de suero a -20°C o menos si no va a ser analizada en el transcurso de los 5 días siguientes. La actividad de la ECA en suero esterilizado es estable hasta 30 días a 2-8°C y durante 6 meses a -20°C o menos. Los **sueros lipémicos** no interfieren en el ensayo por REA de la ECA.

Nota: Muchos autores (como p. ej. 7,8) han informado de que la actividad de la ECA en pacientes bajo medicados con captopril aumenta en función de la duración del almacenamiento. Para evitar la pérdida de la inhibición de la ECA, los sueros de los pacientes medicados con captopril deben ensayarse antes de que transcurran 4 horas desde la recogida de sangre. Si se van a almacenar hasta 12 días, estos especímenes deben conservarse a -70°C (hielo seco). Este fenómeno no ocurre en los sueros de pacientes tratados con otros inhibidores de la ECA tales como enalapril (8).

Otros especímenes: Los procedimientos de extracción para los especímenes de orina y tejido se describen en las referencias 9 a 11.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Prepare 6 minitubos por duplicado para el blanco (calibrador cero), el calibrador y el suero de control. Prepare tubos adicionales por duplicado para cada muestra de los pacientes.
2. Pipetee 10 µl del calibrador "cero", del calibrador, de los controles y de las muestras de los pacientes en los tubos correspondientes.
3. Añada 100 µl de sustrato tritiado (trazador) en cada minitubo. Agite todos los tubos con el vórtex como mínimo durante 5 segundos.
4. Incube todos los tubos durante 60 minutos ($\pm$ 5 minutos) en un baño de agua ajustado a 37°C.
5. Añada 50 µl de solución de ácido clorhídrico 1 N a cada tubo. Agite con el vórtex.
6. Pipetee 1,5 ml de cóctel de centelleo en los tubos. Enrosque los tapones herméticamente y agite con el vórtex durante 5 segundos.

Nota: No etiquete ni los tubos ni los tapones. Cualquier marca podría reducir la eficacia del recuento.

Nota: Deje los minitubos en reposo durante al menos 1 hora antes del recuento.

7. Ponga cada tubo en un vial de centelleo y cuéntelo durante 5 minutos en un contador beta.

RESULTADOS

Cálculo: Registre las cpm de todos los tubos (blanco, calibrador, controles y muestras) y calcule el promedio de cpm de cada par de tubos. Reste el promedio del blanco del ensayo del promedio respectivo de cada par de tubos:

recuentos netos = promedio de cpm - promedio de cpm del blanco

Calcule la correspondiente actividad de la ECA de la muestra o del control dividiendo los recuentos netos de la muestra o del control entre los recuentos del calibrador y multiplicándolo por la actividad de la ECA del calibrador, A_S (indicado en el vial del calibrador):

$$\text{actividad de la ECA} = \frac{\text{recuentos netos de la muestra}}{\text{recuentos netos del calibrador}} \times A_S$$

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

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

Estandarización: Los valores obtenidos con este ensayo son idénticos a los valores obtenidos con el kit de ensayo colorimétrico estándar de BÜHLMANN LABORATORIES AG (ref.: KK-ACE).

Esta estandarización tiene la ventaja de que los resultados obtenidos con el método colorimétrico (KK-ACE), con el método cinético (KK-ACK) o con el método radioenzimático (RK-ACD) son intercomparables.

CONTROL DE CALIDAD

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

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

Se recomienda el uso de una reserva interna adicional de suero como mínimo para el control de calidad interno. Existen en el mercado otros sueros de control (p. ej. Sigma A-6040 o A-7040). Debido a las diferencias metodológicas en el análisis de los sueros de control, los valores documentados en las correspondientes hojas de datos no deben corresponder necesariamente con los datos obtenidos con el ensayo REA ECA de BÜHLMANN.

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

CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Precisión intra-ensayo: 2,2%. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores de cuatro muestras distintas de suero obtenidos en una única prueba. Los valores se presentan en Table 12.

Precisión inter-ensayo: 4,3%. La precisión intraensayo se calculó a partir de cuatro muestras distintas de suero y dos controles ensayados en 20 pruebas diferentes. Los valores se presentan en Table 13.

Linealidad de la dilución: 115%. Se diluyeron tres muestras de suero con calibrador cero (suero sin ECA) y posteriormente se ensayaron siguiendo el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan en Table 14.

Sensibilidad analítica: 0,4 U/l. Se determinaron veinte calibradores cero por duplicado siguiendo los procedimientos del ensayo. Se calcularon la media y la desviación estándar (DE) a partir de los valores de cpm obtenidos. Para determinar la actividad mínima detectable de la ECA, la suma de 2 DE a la media da como resultado un valor de cpm que se calculó tal como se describe en "Resultados".

Sensibilidad funcional: 2,0 U/l. Se probaron cinco muestras distintas de suero con valores medios entre 1,8 y 16,3 U/l 10 veces cada una por duplicado como un intra-ensayo. Se calcularon el coeficiente de variación (CV) y los valores medios de cada muestra. La dosis mínima detectable funcional (DMDF) se observó a un CV del 10%.

Especificidad: Se inhibió una muestra de suero con actividad ECA definida con soluciones diferentes de angiotensina I ($3,8 \times 10^{-3}$ – $3,8 \times 10^{-7}$ mol/l) y EDTA ($1,3 \times 10^{-3}$ – $1,3 \times 10^{-7}$ mol/l) durante dos horas a 18-28°C y posteriormente se ensayó siguiendo el procedimiento del ensayo. Los resultados se presentan en Table 15.

VALORES ESPERADOS Y PUNTO DE CORTE

La actividad de ECA en suero depende considerablemente del genotipo de los objetos de ensayo (12). Por lo tanto, los niveles de referencia están influidos de la frecuencia de los tres genotipos presente en un grupo de donantes de sangre.

El nivel de referencia en suero, determinado en un grupo de **80 adultos** (Suizos a la edad de 20 hasta 70 años) está (cf. Table 16):

26 – 60 U/l

Las muestras de suero de 50 pacientes con sarcoidosis se encontraron en el intervalo de 45-135 unidades (2)

Los niveles de ECA en suero de individuos menores de 18 años de edad son considerablemente más altos y más variables que en adultos. Dichos niveles deben establecerse por separado (3).

COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS

Se compararon 80 sueros de donantes de suero aparentemente sanos (vea arriba), usando el ensayo cinético ACE con el kit colorimétrico ACE y el kit directo radioenzimático ACE (códigos de pedido: KK-ACE y RK-ACD). Los subsiguientes análisis de regresión lineal resultaron en los siguientes datos estadísticos:

ACE direct = 0.65 * ACE colorimetric + 13.7 U/l;
 $r = 0.94$; $r^2 = 0.89$

ACE direct = 0.75 * ACE kinetic + 6.9 U/l;
 $r = 0.96$; $r^2 = 0.93$

APPENDIX I

REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ RÉFÉRENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

1. Lieberman J: *Enzymes in sarcoidosis-angiotensin converting enzyme*. Clin Lab Med **9**, 745-755 (1989).
2. Studdy P R and Bird R: *Serum angiotensin converting enzyme in sarcoidosis – its value in present clinical practice*. Ann Clin Biochem **26**, 13-18 (1990).
3. Bénétteau-Burnat B et al: *Serum angiotensin converting enzyme in healthy and sarcoidotic children: comparison with the reference interval for adults*. Clin Chem **36**, 344-346 (1990).
4. Neels H M et al: *Improved micromethod for assay of serum angiotensin converting enzyme*. Clin Chem **28** (6), 1352-1355 (1982).
5. Lieberman J.: *Elevation of serum angiotensin converting enzyme (ACE) level in Sarcoidosis*. Am J Med **59**, 36-72 (1975)
6. Hurst P L and Lovell-Smith C.J.: *Optimized assay for serum angiotensin converting enzyme activity*. Clin Chem **27**, 2048-2052 (1981).
7. Kamoun P P et al: *Measurements of angiotensin converting enzyme in captopril-treated patients*. Clin Chim Acta **118**, 333-338 (1982).
8. Lieberman J and Zakria F: *Effect of captopril and enalapril medication on the serum ACE test for sarcoidosis*. Sarcoidosis **6**, 118-123 (1989).
9. Baggio B et al: *Increased urine angiotensin I converting enzyme activity in patients with upper urinary tract infection*. Clin Chim Acta **109**, 211-218 (1981).
10. Kato I et al: *Increased urinary excretion of angiotensin converting enzyme in patients with renal disease*. J Clin Chem Clin Biochem **20**, 473-476 (1982).
11. Yokoyama M et al: *Angiotensin converting enzyme in human prostate*. Clin Chim Acta **100**, 253-258 (1980).
12. Biller H, Zissel G, Müller-Quernheim J et al.: *Genotype-corrected reference values for serum angiotensin-converting enzyme*. Eur Respir J **28**, 1085-90 (2006).

Table 11 Example of Results

	cpm	ACE activity (U/l)	CV (%)
Blank	348		
Blank	365		
Blank Avg	357		3.4
Calibrator	4078	52.5	
Calibrator	4229	52.5	
Calibrator Avg	4153	52.5	2.6
Control NORMAL	2461	29.1	
Control NORMAL	2463	29.1	
Control NORMAL Avg	2462	29.1	0.1
Control HIGH	6776	88.8	
Control HIGH	6923	90.8	
Control HIGH Avg	6849	89.8	1.5
Sample 1	3729	46.6	
Sample 1	3573	44.5	
Sample 1 Avg	3651	45.6	3.0
Sample 2	1260	12.5	
Sample 2	1254	12.4	
Sample 2 Avg	1257	12.5	0.3

$$\text{Sample 1} = \frac{3651-357}{4153-357} \times 52.5 = 45.6 \text{ ACE Units}$$

Table 12 Intra-Assay Precision (Within-Run)

Sample	n	Mean (U/l)	SD (U/l)	CV (%)
1	20	52.8	1.6	3.0
2	20	37.4	0.7	1.9
3	20	29.1	0.7	2.5
4	20	23.2	0.4	1.5
Mean				2.2

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

Sample	n	Mean (U/l)	SD (U/l)	CV (%)
Normal Control	20	25.9	1.1	4.2
High Control	20	58.8	2.4	4.0
5	20	52.6	2.1	4.0
6	20	38.9	2.2	5.6
7	20	28.9	1.2	4.3
8	20	23.5	0.9	3.7
Mean				4.3

Table 14 Dilution Linearity/Parallelism

Sample	Dilution	Observed (U/l)	Expected (U/l)	O/E (%)
9	1:1	54.2	—	—
	1:2	31.5	27.1	116
	1:4	15.8	13.6	117
	1:8	7.7	6.8	114
	1:16	4.2	3.4	124
	1:32	2.2	1.7	130
10	1:1	63.6	—	—
	1:2	35.5	31.8	112
	1:4	17.1	15.9	108
	1:8	8.6	8.0	108
	1:16	4.2	4.0	106
	1:32	2.4	2.0	121
11	1:1	56.8	—	—
	1:2	31.3	28.4	110
	1:4	15.8	14.2	111
	1:8	8.2	7.1	115
	1:16	4.1	3.6	115
	1:32	2.2	1.8	124
Mean				115

Table 15 Specificity

Inhibitor	Initial ACE activity [U/l]	Inhibitor concentration [mol/l]	ACE activity after inhibition [U/l]	Inhibition [%]
Angiotensin I	21.7	3.8×10^{-7}	21.5	1
		3.8×10^{-6}	21.5	1
		3.8×10^{-5}	14.7	32
		3.8×10^{-4}	3.9	82
		3.8×10^{-3}	1.2	94
EDTA		1.3×10^{-7}	21.4	1
		1.3×10^{-6}	21.5	1
		1.3×10^{-5}	21.4	1
		1.3×10^{-4}	11.3	48
		1.3×10^{-3}	2.8	87

Table 16 Normal values

	Adults
n	80
Age (years)	20-70
Mean (U/l)	41.1
SD (U/l)	10.0
Mean ± 2SD	21.1 – 61.0
Median (U/l)	40.1
IQR (U/l)	14.6
2.5-97.5th Percentile (U/l)	25.5 – 60.5

Table description: cf. “Results” and “Performance Characteristics” (page 3)

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

Explications relatives aux tableaux: voir „Résultats“ et „Performances“ (page 8)

Descrizione tavola: cf. “Risultati” e “Caratteristiche delle Prestazioni” (pagina 10)

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

RADIOENZYMATIC PROCEDURE							
Conical minitubes in duplicate	Standard, Control, Sample (μ l)	Tracer (μ l)		1N HCl (μ l)		Scintillation Cocktail (μ l)	
Blank	10	100		50		1500	Vortex Place each tube in a scintillation vial
Calibrator	10	100		50		1500	
Control NORMAL	10	100		50		1500	Let the tubes stand for at least 1 hour before counting
Control HIGH	10	100		50	Vortex all tubes	1500	
Patient Serum	10	100	Incubate all tubes for 60 $\pm$ 5 min at 37°C in a waterbath	50		1500	Count each vial for 5 minutes in a beta counter

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 Limite de temperatura
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für „n“ Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Radioactive Material Radioaktives Material matériel radioactif materiale radioattivo material radiactivo

Symbol	Explanation
TR	Tracer Tracer Traceur Elemento tracciante Trazador
CAL	Calibrator Kalibrator Calibrateur Calibratore Calibrador
CAL 0	Zero Calibrator Null Kalibrator Calibrateur Zero Calibratore Zero Calibrador Zero
CONTROL N	Control Normal Kontrolle Normal Contrôle Normal Controllo normale Control normal
CONTROL H	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
SOLN HCL	Hydrochloric Acid Salzsäure Acide chlorhydrique Acido cloridrico Ácido hidroclórico
SCP	Scintillation Powder Scintillationspulver Poudre de scintillation Polvere di scintillazione Polvo de centelleo



Printing Date
2007-10-11