



ACE (Angiotensin converting Enzyme)

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA CINETICA COLORIMETRICA METODO FAPGG (N-[3-(2-furil)acrilil]-L-fenilalanilglicilglicine) dell'Enzima di conversione dell' Angiotensina (ACE) su SIERO E PLASMA con Analizzatore MINDRAY BS-300



500 tests (10 x 10 mL)

REF

NACE8865

DESTINAZIONE D'USO

L' Enzima di conversione dell' Angiotensina (ACE) è una exopeptidasi. E' un enzima circolante nel corpo al sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS); questo è un sistema ormonale che regola la pressione del sangue ed il bilancio idrico.

Quando il volume del sangue è basso, le cellule JG o le cellule granulari nel rene secernono renina direttamente in circolo; la renina plasmatica converte poi l'angiotensinogeno rilasciato dal fegato in angiotensina I. La quale viene successivamente convertita ad angiotensina II dall' ACE (enzima che converte l'angiotensina), enzima trovato nei polmoni.

La Angiotensina II è un potente peptide vasoattivo, che provoca il restringimento dei vasi sanguigni, dando un incremento della pressione sanguigna. L'Angiotensina II stimola anche la secrezione dell'aldosterone, un ormone della corteccia surrenale. Questo costringe i tubuli renali ad incrementare il riassorbimento di sodio ed acqua nel sangue; questo incrementa il volume di fluido nel corpo, che causa inoltre incremento della pressione sanguigna. Se il RAAS è troppo attivo, la pressione sanguigna sarà troppo elevata; Molti farmaci sono in grado di interrompere differenti passaggi in questo sistema, per abbassare la pressione sanguigna.

L'ACE degrada inoltre la bradichinina, un potente vasodilatatore, ed altri peptidi vasoattivi. La inibizione dell'ACE da parte di inibitori-ACE si traduce nella diminuita formazione di angiotensina II e nella diminuzione del catabolismo della bradichinina, originando una dilatazione sistematica delle arterie e delle vene ed una diminuzione della pressione arteriosa.

Inoltre, l'inibizione della formazione di angiotensina II diminuisce la secrezione di aldosterone mediato dall'angiotensina II, portando ad una diminuzione nel riassorbimento di acqua e di sodio ed una riduzione nel volume extracellulare.

Un incremento dei valori di ACE si ritrova nella sarcoidosi, lebbra, ipertensione arteriosa, artrite reumatoide, bronchiti acute e croniche, ipertiroidismo, cirrosi del fegato.

PRINCIPIO

ACE, presente nel siero, catalizza l'idrolisi di FAPGG, formando furilacrililfenilalanina (FAP).

La diminuzione dell'assorbanza nell'unità di tempo a 340 nm è proporzionale all'attività di ACE nel campione.

Usando il Calibratore REF ACECAL8866 è possibile preparare una curva di calibrazione a cui fare riferimento. Riportando sulla medesima i valori di assorbanza e le concentrazioni dei singoli punti, si possono determinare le concentrazioni dei singoli campioni.

PRECAUZIONI D'USO

1. Questo prodotto è stato formulato per uso diagnostico in vitro.
2. Una variazione proporzionale dei volumi di reazione non modifica il risultato.
3. NON miscelare tra loro Reagenti da diversi lotti di produzione.
4. Per concentrazioni di ACE maggiori di 150 U/L, diluire il campione 1:4 con fisiologica, ristare e moltiplicare il risultato x 4.
5. Oltre alle eventuali indicazioni di rischio, il Reagente contiene

conservanti (sodio azide o altri), la cui concentrazione totale è inferiore ai limiti riportati nelle Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE e relative modifiche per la classificazione, etichettatura ed imballaggio di preparati pericolosi (Reagenti).

Tuttavia si raccomanda di manipolare i reagenti con cautela, evitandone l'ingestione ed il contatto con gli occhi, la pelle e le mucose; di seguire quindi le norme di buona pratica di laboratorio nell'utilizzo di questi materiali. Nelle schede di sicurezza vengono descritte le procedure operative per la manipolazione di questo prodotto. Le schede di sicurezza vengono fornite su richiesta.

ATTENZIONE!

A) Le applicazioni su analizzatori di routine possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale; inoltre le procedure sono specifiche per ciascun analizzatore.

B) Elevata attenzione deve essere data alle sostanze interferenti: alcuni farmaci ed altre sostanze potrebbero influenzare i livelli od il dosaggio di ACE (cfr Bibliografia 2).

C) Il Reagente deve essere impiegato SOLO per l'uso indicato, da personale esperto e addestrato, seguendo le norme della buona pratica di laboratorio.

D) La diagnosi clinica non può essere fatta correttamente usando il risultato di un solo test, ma deve essere fatta integrando criticamente i risultati di diversi test di laboratorio con differenti dati clinici.

E) Una serie di fattori, quali la temperatura ambientale, la temperatura dei reagenti di lavoro, l'accuratezza dei lavaggi e il tipo di spettrofotometro, possono influire sulle prestazioni del test.

F) La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.

G) Per la manipolazione dei Reagenti devono essere osservate le precauzioni normalmente adottate in laboratorio.

Tutti i calibratori e controlli vanno considerati come campioni umani, quindi potenzialmente infettivi; devono quindi essere adottate tutte le misure di protezione adeguate allo scopo di evitare ogni tipo di potenziale rischio biologico.

REAGENTI

Composizione del kit:

R1 - BUFFER

Tampone Good >20 mmol/L pH 8.2

R2 - FAPGG

FAPGG > 0.25 mmol/LL

NaN3 < 0.1%

REF NACE8865

2 x 50 mL

10 x 10 mL

STABILITÀ: i Reagenti chiusi sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle etichette, se conservati nel loro contenitore primario integro, a 2-8°C se non esposti a fonti termiche e/o variazioni di pressione. In caso di danneggiamento del contenitore primario provvedere allo smaltimento.

REAGENTI AUSILIARI PER IL CONTROLLO QUALITÀ

Per garantire l'adeguata prestazione del test utilizzare i seguenti kit (vedere le relative informazioni d'uso (IFU)):

- ACE CALIBRATOR Iyo

REF ACEACAL8866

La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni



cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI LAVORO

Dissolvere un vial di **R2 - FAPGG** con 10 mL di **R1 - BUFFER**. Mescolare gentilmente e portare i Reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso.

Chiudere immediatamente dopo l'impiego. I prodotti vanno manipolati in modo adeguato, tale da evitare ogni contaminazione. L'uso non competente ci solleverà da ogni responsabilità.

STABILITÀ DEL REAGENTE DI LAVORO

Il REAGENTE DI LAVORO è stabile 4 settimane a 2-8°C.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Normale attrezzatura da laboratorio.

Micropipette in grado di erogare da 3 a 1000 µL.

Puntali monouso per micropipette.

Provette in vetro trasparente per la diluizione dei campioni.

Soluzione fisiologica, acqua distillata, Calibratori e Controlli.

Spettrofotometro od analizzatore automatico di chimica clinica.

CAMPIONI

• Siero fresco non emolizzato.

• Plasma con eparina. Non usare EDTA!

Raccolta dei campioni in accordo con CLSI (NCCLS)

(cfr Bibliografia 3).

I campioni possono essere conservati fino a 6 giorni a 2-8°C

(cfr. Bibliografia 1).

SMALTIMENTO DEI MATERIALI

Per lo smaltimento dei rifiuti attenersi alle regolamentazioni locali vigenti.

PROCEDURA ANALITICA su SPETTROFOTOMETRO MANUALE

- Lunghezza d'onda: 340 nm
- Cammino ottico: 1 cm
- Lettura: contro aria o acqua distillata
- Temperatura: 37°C
- Metodo: cinetico
- Reazione: 5 + 5 minuti
- Rapporto campione/reagente: 1/10

Portare i reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso.

Pipettare in una provetta o in una cuvetta così etichettata:

S: campione, ST: calibratore:

	S	ST
REAGENTE DI LAVORO	1000 µL	1000 µL
Campione	100 µL	----
Calibratore	----	100 µL

Miscelare gentilmente, incubare per 5 minuti a 37°C.

Leggere l'assorbanza dello standard (Ast1) e del campione (As1).

Ripetere la lettura esattamente dopo 5 minuti a 37°C e leggere nuovamente lo standard (Ast2) e il campione (As2).

Determinare la diff. di assorbanza per il campione e il calibratore:

$$\Delta A_s = A_{1s} - A_{2s}$$

$$\Delta A_{st} = A_{1st} - A_{2st}$$

ATTENZIONE!

Il kit è sperimentato per spettrofotometro manuale e per sistemi HITACHI, COBAS e MINDRAY.

Le applicazioni su analizzatori automatici possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale.

VALORI DI RIFERIMENTO (cfr Bibliografia 4)

Valori normali ACE: 20 - 95 U/L.

Poiché i valori normali dipendono dall'età, dal sesso, dalla dieta,



dall'area geografica e da altri fattori, ogni laboratorio deve stabilire i propri valori normali per questa procedura.

CALCOLO

Inserire le medie trovate nella seguente formula:

$$(\Delta A_s / \Delta A_{st}) \times \text{conc. del calibratore} = \text{U/L di ACE.}$$

PRESTAZIONI ANALITICHE

(validate su MINDRAY BS300)

Le prestazioni del Reagente ACE (Angiotensin converting Enzyme) sono state sperimentate con un analizzatore MINDRAY BS300. I dati, pur rappresentando le caratteristiche del prodotto, potrebbero variare per ogni singolo laboratorio e per i diversi analizzatori.

Limitazioni del metodo: non sono conosciute limitazioni.

Linearità del metodo: il test è lineare fino a 150 U/L.

Tuttavia, per concentrazioni di ACE maggiori del valore massimo del calibratore, si raccomanda di diluire il campione 1:4 con fisiologica, ritestare e moltiplicare il risultato x 4.

Sensibilità del metodo (LoD): il limite di sensibilità, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta dallo zero è 2.6 U/L.

Interferenze: cfr Bibliografia punto 2.

Criterio delle prove di interferenza: recupero $\pm 15\%$ del valore iniziale. Non si sono osservate interferenze su campioni con:

- bilirubina totale fino a 20 mg/dL;
- emoglobina fino a 300 mg/dL;
- lipemia [Intralipid®] fino a 1000 mg/dL;
- acido ascorbico fino a 50 mg/dL.

Precisione nella serie: determinata su 20 replicati di due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (U/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	39.9 ± 1.2	1.5
Umano 2	100.3 ± 1.5	0.7

Precisione tra le serie: determinata per 5 giorni su 20 replicati al giorno per due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (U/L) $\pm 2s$	CV%
Umano 1	39.4 ± 2.1	2.6
Umano 2	99.4 ± 2.8	1.4

Accuratezza: un gruppo di 20 sieri è stato testato con questa procedura ed usando il reagente su analizzatori diversi.

Il confronto ha dato i seguenti risultati:

$$\begin{aligned} \text{Regressione lineare} & y = 0.9985x + 0.475 \\ \text{Coefficiente di correlazione} & r = 0.9995 \quad n = 20 \end{aligned}$$

BIBLIOGRAFIA

1. Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
2. Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).
3. CLSI (NCCLS) C49-A/H56-A: Collection, Handling, Transport and Storage for Body Fluids. Quick Guide.
4. Maguire G.A. et al., Ann. Clin. Biochem. 22, 204 (1985).

CND W01010109





Angiotensin converting Enzyme (ACE) QUANTITATIVE KINETIC COLORIMETRIC ASSAY

FAPGG (N-[3-(2-furyl)acryloyl]-L-phenylalanyl-glycylglycine) METHOD on SERUM and PLASMA with MINDRAY BS-300 Analyzer



REF

500 tests (10 x 10 mL)

NACE8865

INTENDED USE

Angiotensin-converting enzyme (ACE) is an exopeptidase. It is a circulating enzyme that participates in the body's renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS); this one is a hormone system that regulates blood pressure and water fluid balance.

When blood volume is low, JG cells or granular cells in the kidneys secrete renin directly into circulation; plasma renin then converts angiotensinogen released by the liver into angiotensin I. Angiotensin I is subsequently converted to angiotensin II by ACE (angiotensin converting enzyme), enzyme found in the lungs.

Angiotensin II is a potent vaso-active peptide that causes blood vessels to constrict, giving increased blood pressure. Angiotensin II also stimulates the secretion of the aldosterone, a hormone from adrenal cortex.

This one causes the tubules of the kidneys to increase the reabsorption of sodium and water into the blood; this increases the volume of fluid in the body, which also increases blood pressure.

If RAAS is too active, blood pressure will be too high; many drugs are able to interrupt different steps in this system to lower blood pressure.

ACE degrades bradykinin, a potent vasodilator, and other vasoactive peptides.

Inhibition of ACE by ACE-inhibitors results in the decreased formation of angiotensin II and decreased catabolism of bradykinin, leading to systematic dilation of the arteries and veins and a decrease in blood pressure.

In addition, inhibiting angiotensin II formation diminishes angiotensin II-mediated aldosterone secretion, leading to a decrease in water and sodium reabsorption and a reduction in extracellular volume.

An increase of ACE values happens for sarcoidosis, leprosy, arterial hypertension, rheumatoid arthritis, acute and chronic bronchitis, **hyperthyroidism**, cirrhosis of the liver.

PRINCIPLE

The ACE present in the serum catalyzes the hydrolysis of the FAPGG, forming furylacryloylphenylalanine (FAP).

The decrease of absorbance in the unit time at 340 nm is proportional at the activity of the ACE in the sample.

Using our Calibrator **REF ACEACAL8866**, it is possible to prepare a Calibration Curve to refer.

Plotting on the Calibration Curve absorbance values and concentration for each single sample, may be determined the concentration of each sample.

PRECAUTIONS FOR USE

1. This product has been formulated for in vitro diagnostic use.
2. A proportional variation of the reaction volumes does not change the result.
3. DO NOT mix Reagents from different Production lots.
4. For concentration of ACE higher than 150 U/L, dilute the sample 1:4 with saline solution, repeat the determination and multiply the result by 4.
5. In addition to the possible risk indications, the Reagent can contain preservatives (as sodium azide or others), which total concentration is lower than the limits mentioned in Dir. 67/548/CEE

e 88/379/CEE and following modifications regarding classification, labelling and packaging of dangerous preparations (Reagents). However it is recommended to handle the reagents carefully, avoiding ingestion and contact with eyes, mucous membranes and skin; to use reagents according to good laboratory practice. On the material safety data sheet are detailed the operating procedures for the manipulation of this product. Material safety data sheet should be supplied on request.

ATTENTION!

A) Applications on routine analyzers may be totally different from what developed as manual determination; in addition the procedures are specific for each analyzer.

B) Very deep attention must be given to interfering substances: certain drugs and other substances are able to influence levels of ACE (see References 2).

C) The reagent must be used ONLY for the intended destinations, by expert and trained people and in according to good laboratory practice.

D) The clinical diagnosis cannot be done correctly using the result of only one test, but have to be done integrating critically the results of different laboratory tests and clinical data.

E) A lot of factors, as ambient temperature, the working reagent temperature, wash accuracy and the type of spectrophotometer, may affect the tests performances.

F) The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

G) All the precautions normally used in the laboratory must be respected for reagents handling.

All the calibrators and controls must be considered as human sample, so potentially infectious; all the protection actions must be applied to avoid any potential biological risk.

REAGENTS

Components of the kit:

R1 - BUFFER

Good Buffer >20 mmol/L

R2 - FAPGG

FAPGG > 0.25 mmol/LL

NaN3 < 0.1%

REF NACE8865

2 x 50 mL

10 x 10 mL

STABILITY: the Reagents are stable up to the expiry date mentioned on the labels, stored at 2-8°C, if closed and kept in their intact primary container; if not exposed to heat sources and/or pressure variations.

In case of damaging of the primary container organize the waste disposal.

AUXILIARY REAGENTS FOR QUALITY CONTROL

To grant the right performances use following kits (see the relative information for use (IFU)):

- ACE CALIBRATOR Iyo

REF ACE ACAL8866

The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

PREPARATION OF THE WORKING REAGENT

Dissolve a vial of **R2 - FAPGG** with 10 mL of **R1 - BUFFER**

Mix gently and let the reagent reach the room temperature before use. Close immediately after handling.



The Reagents have to be used correctly, to avoid contamination. An incompetent handling relieves us from any responsibility.

STABILITY OF THE WORKING REAGENT

The WORKING REAGENT is stable 4 weeks at 2-8°C.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Normal laboratory equipment.

Micropipettes to deliver from 3 to 1000 µL.

Disposable micropipettes tips .

Transparent glass tubes for sample dilution.

Saline solution, distilled water, Calibrators and Controls.

Spectrophotometer or automatic analyzer for Clinical Chemistry.

SAMPLES

• Not haemolysed fresh serum.

• Not haemolysed fresh plasma plasma with heparin. EDTA cannot be used!

Samples collection in compliance with CLSI (NCCLS)

(see References 3).

The sample can be stored at 2-8°C, up to 6 days.

(see References 1).

WASTE DISPOSAL

Observe all federal, state and local environmental regulations for waste disposal.

ANALYTICAL PROCEDURE ON MANUAL SPECTROPHOTOMETER

- Wavelength: 340 nm
- Pathlength: 1 cm
- Reading: against air or distilled water
- Temperature: 37°C
- Method: end-point
- Reaction: 5 + 5 minutes
- Sample/reagent: 1/20

Let reagents reach the working temperature before use.

Pipette in a test tube or cuvette so labelled:

R/B: Reagent Blank, ST: Calibrator, S: Sample

	S	ST
WORKING REAGENT	1000 µL	1000 µL
Sample	100 µL	----
Calibrator	----	100 µL

Read the absorbance of standard (Ast1) and sample (As1). Exactly after 5 minutes at 37°C read again standard (Ast2) and sample (As2).

Determine the diff. of absorbance for sample and calibrator:

$$\Delta A_s = A_{1s} - A_{2s}$$

$$\Delta A_{st} = A_{1st} - A_{2st}$$

ATTENTION!

The kit is tested for a manual spectrophotometer and for HITACHI, COBAS and MINDRAY systems. The applications on automatic analysers could be completely different by what has been developed as manual determination.

REFERENCE VALUES (see References 4)

Normal Values ACE: 20 - 95 U/L.

Since the normal values depend on age, sex, diet, geographic area and other factors, each laboratory should establish its own normal values for this procedure.

CALCULATION

Insert the means found in the following formula:

$(\Delta A_s / \Delta A_{st}) \times \text{Calibrator conc.} = \text{U/L of ACE.}$



ANALYTICAL PERFORMANCES

(validate on MINDRAY BS300)

The performances of the Reagent ACE (Angiotensin converting Enzyme) have been tested with a MINDRAY BS300 analyzer. The data, while representing the characteristics of the product, could be different for each laboratory and for different analyzers.

Method Limitations: are not know limitations.

Method Linearity: the test is linear up to 150 U/L.

However, for ACE concentrations higher than 150 U/L, it is recommended to dilute the sample 1:4 with saline solution, test again and multiply the result x 4.

Method Sensitivity (LoD): the sensitivity limit, that is the minimum concentration that can be distinguished by zero, is 2.6 U/L.

Interferences: see References 2.

Interference test criterion: recovery \pm 15% of initial value. No interference found on samples with:

- total bilirubin up to 20 mg/dL;
- haemoglobin up to 300 mg/dL,
- lipemia [Intralipid®] up to 1000 mg/dL;
- ascorbic acid up to 50 mg/dL.

Within-run Precision: determined on 20 replications of 2 samples.

The results obtained are following:

Sample	Mean (U/L) \pm 2s	CV %
Human 1	39.9 \pm 1.2	1.5
Human 2	100.3 \pm 1.5	0.7

Run-to-run Precision: determined for 5 days with 20 replications for each days, for two samples.

The results obtained are the following:

Sample	Mean (U/L) \pm 2s	CV %
Human 1	39.4 \pm 2.1	2.6
Human 2	99.4 \pm 2.8	1.4

Accuracy: a group of 20 sera has been tested using this procedure and using the reagent on different analyzers.

The comparison gave these results:

Linear regression equation $y = 0.9985x + 0.475$

Correlation coefficient $r = 0.9995$ $n = 20$

REFERENCES

1. Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
2. Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).
3. CLSI (NCCLS) C49-A/H56-A: Collection, Handling, Transport and Storage for Body Fluids. Quick Guide.
4. Maguire G.A. et al., Ann. Clin. Biochem. 22, 204 (1985).

