

# НАБОР ДЛЯ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АНГИОТЕНЗИН ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА ЭНЗИМАТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

## КК-АСК, ACE kinetic

Каталог. № : **КК-АСК** Методика от 26-11-2012  
Количество : **100**  
Производитель: **BÜHLMANN**  
**LABORATORIES AG, (Швейцария)**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

### НАЗНАЧЕНИЕ

Набор BÜHLMANN ACE предназначен для прямого и количественного определения активности ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ) в человеческой сыворотке энзиматическим методом.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Ангиотензин-превращающий фермент (АСЕ) катализирует превращение ангиотензина I в ангиотензин II. Фермент также способствует расщеплению синтетического субстрата (FAPGG) в производную аминокислоты и дипептид. Кинетика этой реакции расщепления измеряется путем записи уменьшения поглощения при 340 нм (1,2). Кинетический метод АПФ стандартизирован с колориметрическим набором BÜHLMANN ACE в соответствии с исходным методом, описанным в 3 и 4.

### ПОСТАВЛЯЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ И ИХ ПОДГОТОВКА

Таблица 1

Реагенты	Количество			Код	Разведе- ние
	КК- АСК/КК- АСК4	КК-АСК2	КК-АСКX		
Субстрат	1 флакон/ 4 флакона 26 мл	2 флакона 13 мл	3 флакона 100 мл	B-ACK-SUB B-ACK2- SUB <sup>1</sup> B-ACKX- SUB <sup>2</sup>	Готов к использова нию
Калибра- тор <sup>3</sup>	1 флакон/ 2 флакона	2 флакона	3 флакона	B-ACK-CA	Добавить 2 мл стерильной воды
Контроли <sup>4</sup> Нормаль- ный и Высокий	1x2 флакона/ 2x2 флакона	2x2 флакона	3x2 флакона	B-ACK- CONSET	Добавить 2 мл стерильной воды

1 Коды заказа для КК-АСК2.

2 Коды заказа для КК-АСКX.

3 Лиофилизированный калибратор АСЕ в белковой сывороточной матрице со специфичной для отдельного лота активностью. После восстановления оставить на 15 минут при 18-28 °С и хорошо перемешать перед употреблением. Калибратор был стандартизирован с колориметрическим набором BÜHLMANN ACE (см. выше).

4 Лиофилизированные Нормальный и Высокий Контроли АСЕ в белковой сывороточной матрице со специфичной для отдельного лота активностью. Развести в течение 15 минут при 18-28 °С и перед использованием хорошо перемешать.

### ХРАНЕНИЕ И СРОК ГОДНОСТИ РЕАГЕНТОВ

Таблица 2

Не вскрытые Реагенты	
Хранить при 2-8°С до истечения срока годности, указанного на этикетках.	
Открытые / Разведенные реагенты	
Субстрат	Стабилен при 2-8°С до истечения срока годности
Калибратор	Стабильны при 2-8°С до шести месяцев.
Контроли	

### МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

- Калибратор и Контроли, поставляемые в данном наборе, содержат компоненты человеческого происхождения. Каждый донор сыворотки, использованной при приготовлении данных реагентов, был протестирован методами, одобренными FDA, с отрицательными результатами на HBV поверхностный антиген, HCV и HIV1/2 антитела. Так как не существует метода, достаточно достоверного, гарантирующего отсутствие инфекций, то нельзя быть уверенным, что данные материалы не могут переносить гепатиты или ВИЧ. Следовательно, со всеми образцами крови пациентов, а также реагентами набора необходимо обращаться как с возможными переносчиками инфекций. Со всеми продуктами, содержащими компоненты человеческого происхождения, необходимо обращаться в соответствии с установленными правилами, соблюдая необходимые меры безопасности.
- Неиспользованный Раствор уничтожить в соответствии с местными правилами по обращению с отходами.

### ТЕХНИЧЕСКИЕ МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

#### Компоненты набора

- Внимательно прочитайте инструкцию перед проведением теста. Проведение испытания будет нарушено, если реагенты некорректно разбавлены, модифицированы или хранятся в условиях, отличных от тех, которые указаны в этой инструкции для использования:
- Компоненты не должны использоваться после истечения срока годности, указанного на этикетке.
- Не смешивать реагенты из различных лотов.
- Не допускать перекрестного загрязнения между реагентами, образцами или между лунками.
- Микролунки не могут быть использованы повторно.

### НЕОБХОДИМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- Калиброванные пипетки со сменными наконечниками: 25, 100, 150, 200 мкл и 2 мл.
- Пластиковые пробирки для приготовления разведений образцов.
- Вортекс
- Водяная баня на 37 °С
- Спектрофотометр с контролируемой температурой держателя кюветы для инкубации при 37 °С и для измерения поглощения при 340 нм
- Клинический химический анализатор с фильтром на 340 нм (опция)

### СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

Так как ЭДТА подавляет активность АПФ, образец сыворотки следует использовать для определения активности АПФ.

Соберите достаточное количество крови (по крайней мере 0.5 мл) из вены в соответствующую пробирку без антикоагулянта. Дайте ей свернуться в течение 2-3 часов при комнатной температуре, центрифугируйте при 4 °С и 1000 x g и соберите сыворотку. Заморозьте образец сыворотки при -20 °С, если он не анализируется в течение 5 дней. Активность АСЕ в стерильной сыворотке стабильна в течение 30 дней при температуре 2-8 °С и 6 месяцев при температуре -20 °С.

Чтобы избежать липемических образцов сыворотки, пробы крови должны быть взяты у пациентов натощак.

### ПРОЦЕДУРА МЕТОДА

**Протокол анализа** (для автоматической процедуры см. следующую главу ниже).

Привести Субстрат к комнатной температуре. Избегайте нагревания субстрата. Обработайте все липемические образцы сыворотки в соответствии с процедурой, описанной выше.

- Пометить две пластиковые пробирки для калибратора и контролей и образцов.
- Внести 25 мкл Калибратора, Контрольной сыворотки и образца пациента, соответственно, в соответствующие пробирки.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Измерение активности фермента, как описано ниже, должно проводиться в соответствии с мощностью соответствующего фотометра.

- Добавить 250 мкл субстрата к каждому образцу и перемешать на вортексе тщательно.
- Инкубировать в течение 5 минут при 37 °С на водяной бане.
- Обнулить фотометр на дистиллированную воду.
- Переместить калибраторы, контроли и образцы в микрокюветы, инкубировать их при 37 °С и измерить образцы дважды с интервалом ровно 10 минут при 340 нм.

## СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Результаты, полученные с помощью этого теста, идентичны со значениями, полученными со стандартным колориметрическим анализом BÜHLMANN ACE. Кинетический анализ ACE (КК-АСК) стандартизован относительно эталонного метода, установленного Lieberman (3).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И АВТОМАТИЗАЦИЯ

### Автоматизация с Клиническими Анализаторами

Кинетический анализ ACE может быть выполнен на любом открытом химическом анализаторе. Bühlmann поможет вам адаптировать ваши настройки прибора. Для того, чтобы гарантировать, эквивалентные кинетические характеристики между ручной и автоматизированной версиями мы рекомендуем использовать объемы и/или разведения, установленные для ручной версии. Для получения инструкций по программированию и эксплуатации, пожалуйста, обратитесь к "Руководству оператора" Инструмента. Мы также советуем, чтобы каждая лаборатория оценивала работу анализа на своём инструменте.

НАСТРОЙКИ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ НЕСКОЛЬКИХ КЛИНИЧЕСКИХ ХИМИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ ПРЕДОСТАВЛЯЮТСЯ ПО ЗАПРОСУ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И РАСЧЕТ

Рассчитать соответствующую активность фермента ( $E_x$ ) каждого неизвестного образца путем деления разности оптической плотности отдельного образца ( $\Delta A_x$ ) на среднее изменение абсорбции флакона калибратора ( $\Delta A_c$ ) и умножением результатов на значения активности фермента ( $E_c$ ), указанные на листе данных (для примера см. Таблицу 11):

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

**Автоматизируемая процедура:** Для расчета результатов используйте режим RATE. Обратитесь к инструкции для более подробной информации.

**Определение:** Одна единица активности АПФ определяется как количество фермента, необходимое для освобождения одного мкмоль Гиппуровой Кислоты в минуту, и на литр сыворотки при 37 °С, как определено с помощью колориметрического анализа:

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

## КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Значения Нормального и Высокого Контролей, входящих в набор, должны быть в пределах значений партии, указанных на соответствующем листе. В противном случае, тест должен быть повторен.

Надлежащей лабораторной практикой предусмотрена запись следующих данных для каждого анализа: номер партии, даты восстановления компонентов набора, значения концентрации калибратора и контроля, величины концентрации внутреннего пула в сыворотке крови.

## ТЕХНИЧЕСКИЕ ОГРАНИЧЕНИЯ

- Из-за интерференции при фотометрическом определении липемическую сыворотку необходимо предварительно обработать либо на Ультрацентрифуге, либо с LipoClear от StatSpin Inc. Иктерическая или гемолитическая сыворотка не может быть использована для определения активности ACE.
- Результаты теста интерпретировать вместе с информацией, полученной при проведении клинических исследований и других процедур.

## ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

**Воспроизводимость внутри серии: 2.7%.** Воспроизводимость внутри серии рассчитывалась по результатам анализа трех различных образцов сыворотки 20 раз, полученных в одной постановке (См. таблицу 12).

**Воспроизводимость между сериями: 8.1%.** Воспроизводимость между сериями рассчитывалась по результатам анализа 3 контрольных сывороток в 20 последовательных измерениях (См. таблицу 13).

**Линейность разведения: 108.9%.** 14 образцов сыворотки с повышенной активностью АПФ (диапазон: 100-172 Ед/л) были разбавлены физиологическим раствором NaCl от 1:1 до 1:32 в различных анализах. В общей сложности 140 значений были проанализированы. Среднее значение линейности разведения (полученное в сравнении с ожидаемым) составило 108.9% и 5-95-ый процентили составили 90-137% (см. таблицу 14 и Рисунок 1).

Кинетический метод является линейным до, по меньшей мере, 150 Ед/л.

**Восстановление после насыщения: 99.8%.** Два разных образца сыворотки были насыщены с увеличением количества ACE и анализировались в соответствии с процедурой анализа (см. Таблицу 15).

**Предел обнаружения (LoB): <5 Ед/л.** Аналитическая чувствительность зависит от точности клинического химического анализатора, который используется. По повторных измерениях с водой (бланк реагент) неточность анализатора определяется путем вычисления среднего значения +3 SD и конвертации его в ACE Ед/л. Для Cobas Mira предел обнаружения прибора рассчитывается как 2.5 Ед/л (n = 100) и для анализатора Kone T30 как 3.6 Ед/л (n = 33).

**Предел обнаружения (LoQ): ~12 Ед/л.** Функциональная чувствительность была определена путем повторных измерений (n = 356) серии сывороток (n = 45) с активностью от средней до низкой (диапазон: 1.5-35.5 Ед/л). ACE активность при 20% CV была определена как 12 Ед/л.

**Специфичность:** Ингибирование природным субстратом Ang I и ЭДТА и H-Val-Trp-OH. Образец сыворотки определенной активности АПФ была ингибирован и проанализирован снова (см. таблицу 16).

## РЕФЕРЕНСНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ

Активность АПФ в сыворотке сильно зависит от генотипа исследуемых пациентов (5). Поэтому, эталонные значения зависят от генетического образца доноров и различия могут быть объяснены по частоте этих трех генотипов в группе доноров по исследованию.

Из группы 80 взрослых (в возрасте 20-70 лет) здоровых доноров крови из Швейцарии, референсный диапазон (2.5-97.5-ой Перцентиль) была определена как (см. Таблица 17):

20 - 70 Ед/л

В исследовании 159 кавказских добровольцев, классифицированных как практически здоровые в медицинском обследовании, были протестированы на активность АПФ. Не было обнаружено корреляции между активностью АПФ сыворотки и возрастом. Среднее значение 45.1 Ед/л и нормальный диапазон (2.5-ой -97.5-ой Перцентиль) от 16 - 85 Ед/л были описаны (5).

В исследовании 50 пациентов с саркоидозом сывороточные уровни АПФ были в диапазоне 45-135 Ед/л (6).

Сывороточные уровни АПФ у детей значительно выше и более изменчивы, чем у взрослых (5). Elmlinger и др. (Детская больница, Тюбинген, Германия), провели осмотр 84 детей от 6 месяцев до 18 лет для оценки референсного диапазона ACE в сыворотке. Нормальный диапазон сыворотки (2.5-97.5-ый перцентиль) был определен как (см. Таблица 17):

29 - 112 Ед/л

Никаких существенных различий не наблюдалось при разделении на гендерные или возрастные категории. У новорожденных (от 0 до 6 месяцев) была обнаружена очень низкая активность АПФ (данные не показаны).

## СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ

80 сывороток от здоровых доноров (смотри выше) были проанализированы в трех различных анализах от BÜHLMANN AG. Результаты кинетического анализа ACE, колориметрического анализа ACE и прямого радиоферментного анализа ACE были соотнесены:

ACE кинетический = 1,065 \* ACE колориметрический – 6.05 Ед/л;

r = 0.94; R<sup>2</sup> = 0.88

ACE кинетический = 1,368 \* ACE прямой - 13,96 Ед/л;

r = 0.94; R<sup>2</sup> = 0.89



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»

ул. Чорновола, 97

г. Ивано-Франковск, 76005

тел.: +38 (0342) 775 122

факс: +38 (0342) 775 123

e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)

[www.diameb.com](http://www.diameb.com)