

Utilisation

Pour la détermination cinétique quantitative de l'activité α -amylase dans le sérum humain à l'aide des analyseurs Yumizen C230 et Yumizen C240. **A usage médical uniquement.**

Signification clinique

La détermination de l'activité de l'amylase dans le sérum est le plus souvent effectuée pour le diagnostic et le traitement des maladies du pancréas.

Historique

L'amylase a d'abord été mesurée quantitativement par une méthode iodométrique introduite par Wohlegemuth en 1908. ¹ Somogyi a introduit une procédure en 1938 qui a normalisé les quantités d'amidon et d'iode. ² Ses travaux sont devenus la base des méthodes amyloclastiques et saccharogènes largement utilisées introduites en 1956³ et 1960⁴ respectivement. Les inconvénients de ces méthodes comprenaient de longs temps d'incubation, une interférence endogène du glucose et des couleurs de réaction instables entraînant une reproductibilité et une fiabilité médiocres.

Rinderknecht et al ont introduit une méthode d'amidon couplé à un colorant en 1967⁵ qui était relativement simple à réaliser. Cependant, la procédure utilisait un substrat insoluble, manquait de linéarité et nécessitait toujours une centrifugation ou une filtration.

Des procédures turbidimétriques ont été introduites⁶ qui sont relativement rapides mais qui nécessitent une instrumentation spéciale et ont du mal à produire des solutions d'amidon stables et reproductibles.

Plusieurs procédures enzymatiques ont été suggérées^{7,8} dont une qui utilisait le substrat défini maltotétraose. ⁹ Ces méthodes représentaient une amélioration significative de la mesure de l'amylase, mais étaient encore soumises à des temps de pré-incubation relativement longs, à une interférence possible du glucose endogène et à une série d'autres interférences potentielles avec la formation de NADH. ¹⁰

Wallenfels et al.¹¹ ont introduit les p-nitrophénylglycosides comme substrats définis pour la détermination de la α -amylase dans le cadre d'une procédure qui éliminait les interférences du glucose et du pyruvate endogènes. Diverses enzymes de couplage ont été utilisées pour hydrolyser les oligosaccharides à chaîne courte résultant de l'activité de l'amylase dans le spécimen. Malheureusement, ces enzymes de couplage contenaient une activité résiduelle de l'amylase qui nuisait à la stabilité de ces réactifs.

La présente méthode est basée sur l'utilisation d'un substrat chromogénique, le 2-chloro-p-nitrophénol lié au maltotriose. La réaction de l'amylase avec ce substrat entraîne la formation de 2-chloro-p-nitrophénol, qui peut être mesuré par spectrophotométrie à 405 nm. Cette réaction se déroule très rapidement, aucune enzyme de couplage n'est nécessaire et la réaction n'est pas facilement inhibée par des facteurs endogènes.

Principe

α -amylase

10 CNPG3 $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$ 9 CNP + CNPG2 + 9G3 + G

α -L'amylase hydrolyse le 2-chloro-p-nitrophényl- α -D-maltotrioside (CNP3) pour libérer le 2-chloro-p-nitrophénol et former le 2-chloro-p-nitrophényl- α -D-maltoside (CNP2), la maltotriose (G3) et le glucose (G). Le taux d'augmentation de l'absorbance est mesuré à 405 nm et est proportionnel à l'activité α -amylase dans l'échantillon.

Réactifs

Tampon MES, pH 6,0±0,1, 2-chloro-p-nitrophényl- α -D-maltotrioside 1,8 mM, chlorure de sodium 350 mM, acétate de calcium 6 mM, thiocyanate de potassium 900 mM, azoture de sodium 0,1 % (voir « Précautions »).

Préparation du réactif

Le réactif est fourni sous forme de liquide prêt à l'emploi. Aucune préparation n'est requise.

Stockage du réactif

1. Conserver le réactif entre 2 et 8 °C.
2. Le réactif est stable jusqu'à la date d'expiration s'il est stocké comme indiqué.

Détérioration du réactif

1. Ne pas utiliser si :
2. L'absorbance du réactif de travail est supérieure à 0,600 lorsqu'elle est mesurée à 405 nm par rapport à l'eau dans une cuvette d'une longueur de trajet de 1 cm.

3. Le réactif ne répond pas aux paramètres de performance indiqués.
4. Le réactif est trouble ou présente d'autres signes de contamination bactérienne.

Précautions

1. Ce kit de réactif est destiné à un usage de diagnostic *in vitro* uniquement.
2. Ce réactif contient du thiocyanate de potassium. POISON. Ne pas ingérer.
3. Ce réactif contient de l'azote de sodium (0,1%) comme agent de conservation. Ne pas ingérer. Il peut réagir avec des tuyaux en cuivre ou en plomb pour former des azides métalliques explosifs. Au moment de l'élimination, rincer avec un grand volume d'eau pour éviter l'accumulation d'azote.
4. Tous les échantillons et témoins doivent être manipulés comme potentiellement infectieux, en utilisant des procédures de laboratoire sûres. (NCCLS M29-T2) ¹²

Prélèvement et manipulation des échantillons

1. Le sérum non hémolysé est l'échantillon de choix. Les échantillons doivent être prélevés conformément au document H4-A3 du NCCLS. ¹³
2. Les anticoagulants, tels que le citrate et l'EDTA, lient le calcium nécessaire à l'activité de l'amylase. Le plasma avec ces anticoagulants ne doit pas être utilisé.
3. L'amylase dans le sérum est stable pendant une semaine à température ambiante (18-25 °C) et pendant deux mois lorsqu'elle est conservée au réfrigérateur à 2-8 °C. ¹⁴

Interférences

1. Un certain nombre de médicaments et de substances affectent la détermination de l'amylase. ^{15,16} Young et al ont publié une liste complète de ces substances. ¹⁷
2. La macroamylase dans l'échantillon peut provoquer une hyperamylasémie mesurée, qui pourrait conduire à un faux diagnostic de pancréatite aiguë. Cependant, aucun symptôme clinique n'est généralement associé à la macroamylasie. ¹⁸
3. La bilirubine (30 mg / dl) et l'hémoglobine (500 mg / dl) se sont avérées avoir un effet négligeable sur cette procédure.
4. Il a été rapporté que des échantillons lipémiques allant jusqu'à 1000 mg / dl n'avaient aucun effet sur les déterminations de l'amylase sérique. ¹⁹

Matériaux fournis

Réactif amylase (CNP3).

Matériel requis mais non fourni

1. Analyseur Yumizen C230 / Yumizen C240
2. Yumizen C230 / Yumizen C240 Manuel d'utilisation
3. Contrôle de chimie, numéro de catalogue C7592-100

Paramètres test

Test:	AMY	Chemistry:	Amylase
Chemistry No.:	204	Print Name:	Amylase
Reaction Type:	Kinetic	Reaction Direction:	Positive
Pri. Wave:	405 nm	Sec. Wave:	
Decimal.:	0	Samp. Type:	Serum
Blank Time:		Reaction Time:	3 11
Unit:	U/L	Incubation Time:	0

	Sample Vol.	Aspirated	Diluent	Reagent Vol.	Diluent
Standard;	5	uL	uL	R1: 200	uL uL
Decreased;		uL	uL		
Increased;		uL	uL		

Linearity Range (Standard):	0-2000	Linearity Limit:	0.3
Linearity Range (Decreased):		Substrate Depletion:	25000
Linearity Range (Increased):		Mixed Blank Abs.:	- 40000 40000
R1 Blank Abs.:	- 40000 40000	On-board Stability:	30 Day (s)
Blank Response	- 40000 40000	Reagent Alarm Limit:	5
Twin Chemistry:			

Prozone Check:		
Q1:	Q2:	Q3:
Q4:	PC:	ABS:

Use Qualitative Result:	Range:	Flag:
-------------------------	--------	-------

Pointe Amylase (CNP3) Kit réactifs

Slope Offset:	Slope 1	Offset 0	Unit U/L
---------------	------------	-------------	-------------

Pretreatment:			
Pretreat Sample Vol.:	uL	Pretreat Reagent Vol.:	uL

Ref. Range:					
Sample Type:	Gender:	Age Range:	Ref. Range:	Critical Range:	Unit:

Paramètres d'étalonnage

Chem:	AMY				
Calibration Setting	Math Model: K Factor	Factor: 3178.000	Replicates: 2		
Acceptance Limits	Cal Time: 24 hr.	Slope Diff:	SD:		
	Sensitivity:	Repeatability:		* User Defined	
	Deter Coeff:				
Auto Calib.					
	<input type="checkbox"/> Cal Time				

Limites

- Les échantillons qui dépassent la limite de linéarité (2000 U/L) doivent être dilués avec un volume égal de solution saline, analysés de nouveau et multiplier le résultat par deux.
- La macroamylase dans l'échantillon peut provoquer une hyperamylasémie mesurée, qui pourrait conduire à un faux diagnostic de pancréatite aiguë. Cependant, aucun symptôme clinique n'est généralement associé à la macroamylasie.¹⁸

Calibration

Le mode opératoire est normalisé au moyen de l'absorptivité millimolaire du 2-chloro-p-nitrophénol qui est de 12,9 à 405 nm dans les conditions d'essai décrites.

Calculs (Exemple)

$$\frac{\Delta \text{Abs./min} \times \text{TV} \times 1000}{\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}} = \text{U/L } \alpha\text{-amylase dans l'échantillon}$$

Où: $\Delta \text{Abs./min}$ = Différence d'absorbance par minute
 TV = Volume total du dosage (1,025 ml)
 1000 = Conversion de U/ml en U/L
 MMA = Absorptivité millimolaire du 2-chloro-p-nitrophénol (12,9)
 SV = Volume de l'échantillon (0,025 ml)
 LP = Trajet lumineux (1 cm)

$$\frac{\Delta \text{Abs./min} \times 1,025 \times 1000}{12,9 \times 0,025 \times 1,0} = \Delta \text{Abs./min} \times 3178 = \text{U/L } \alpha\text{-amylase}$$

Exemple : Si $\Delta \text{Abs./min} = 0,03$, then $0,03 \times 3178 = 95 \text{ U/L}$

NOTE : Pour convertir en unités SI (nKat/L), multipliez la valeur U/L par 16,67.

Contrôle qualité

La validité de la réaction doit être surveillée par l'utilisation de sérums témoins avec des valeurs d'amylase normales et anormales connues. Ces contrôles doivent être effectués au moins à chaque période de travail au cours duquel des dosages de l'amylase sont effectués. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre fréquence de détermination du contrôle. Les exigences de contrôle de la qualité doivent être effectuées conformément aux réglementations locales, étatiques et / ou fédérales ou aux exigences d'accréditation.

Valeurs attendues

Sérum: 25-125 U/L pour une méthode cinétique similaire.²⁰ Étant donné que les valeurs attendues sont influencées par l'âge, le sexe, le régime alimentaire et la situation géographique, chaque laboratoire est fortement invité à établir sa propre plage de référence pour cette procédure.

Performance

- Linéarité : 0-2 000 U/L
- Comparaison : Une étude a été réalisée entre la série Yumizen 200 et un analyseur et une méthode similaires, ce qui a donné un coefficient de corrélation de 0,999 et l'équation de régression linéaire était $y = 0,963x + 1,7$ (n = 33).

- Precision: Des études de précision ont été réalisées à l'aide de l'analyseur Yumizen série 200 à la suite d'une modification des lignes directrices contenues dans le document EP5-T2 du NCCLS.²¹

Sur une exécution (n=20)

Sur une exécution (n=20)			Au quotidien (n=20)		
Moy	S.D.	C.V.%	Moy	S.D.	C.V.%
50.4	2.3	4.5	64.6	2.0	4.7
537.0	17.0	3.2	425.6	12.1	2.8

- Sensibilité : La sensibilité du réactif Amylase a été étudiée en lisant le changement d'absorbance par minute à 405 nm pour un échantillon de solution saline et un sérum avec une concentration connue. Dix répétitions de chaque échantillon ont été effectuées. Les résultats de cette enquête ont indiqué que, sur l'analyseur utilisé, le réactif de l'amylase liquide présentait peu ou pas de dérive du réactif sur un échantillon nul. Dans les conditions de réaction décrites, 1 U/L d'activité amylase donne un $\Delta \text{Abs./min}$ de 0,0003.

Références

- Wohlegemuth, J., Bio Chem. 29:1 (1908).
- Somogyi, M., J. Biol Chem. 125:399 (1938).
- Street, H.V., Close, J.R., Clin Chim Acta 1:256 (1956).
- Henry, R.J., Chiamori, N., Clin. Chem. 6:434 (1960).
- Rinderknecht, H.P., et al, Experientia 23:805 (1967).
- Zinterhofer, L., et al, Clin. Chem. Acta 43:5 (1973).
- Tietz, N.W., et al, Abs. of Proc. Of Int'l Seminar and Workshop on Enzymology, Chicago, IL (May 1972).
- Schiwara, H.W., Artzl. Lab 17:340 (1971).
- Pierre, K.J., et al, Clin. Chem. 22:1219 (1976).
- Kaufman, R.A., Tietz, N.W., Clin. Chem. 26:7:851 (1980).
- Wallenfels, K., et al, Carbohydrate Research 61:359 (1978).
- NCCLS document "Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue", 2nd Ed. (1991).
- NCCLS document "Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Skin Puncture", 3rd Ed. (1991).
- Tietz, N.W. Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp. 725-734 (1986).
- Elking, M.P., Kabot, H.J., Amer. J. Hosp. Pharm. 25:485 (1968).
- Bogoch, A., et al, Gastroenterology 26:697 (1954).
- Young, D.S., et al, Clin Chem 21:1D (1975).
- Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p. 627 (1982).
- Young, D.S. and Friedman, D.S., Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests, 2nd Ed., AACC Press (1989).
- Tietz, N.W., Clinical Guide to Laboratory Tests, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p. 54 (1983).
- NCCLS document "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2nd Ed. (1992).

Symboles

Use by (YYYY-MM-DD)	LOT Lot and batch code
REF Catalog number	Manufacturer
IVD In vitro diagnostic medical device	Temperature limitation
Consult instructions for use	Rx Only: Prescription Use Only
CE mark	EC REP Authorized representative in the European Community

REF 12-A7564-120 Manufactured by HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand 5449 Research Drive Canton, MI 48188 **IVD**

Manufactured by HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

European Authorized Representative:
Obelis s.a.
Boulevard Général Wahis 53
1030 Brussels, BELGIUM

Tel: (32)2.732.59.54 Fax:(32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net



Réactifs certifiés

Pointe Amylase (CNP3) Kit réactifs

Les réactifs Pointe sont certifiés pour être fabriqués selon des paramètres spécifiés.
Tout produit réactif Pointe ne répondant pas aux spécifications jusqu'à la date
d'expiration indiquée sera corrigé immédiatement et sans frais.

Rev. 11/23 P803-A7564-MIN-FR
