

Προβλεπόμενη χρήση

Για τον ποσοτικό κινητικό προσδιορισμό της δραστηριότητας της α-αμυλάσης σε ανθρώπινο ορό με τη χρήση των αναλυτών Yumizen C230 και Yumizen C240. **Rx Only.**

Κλινική σημαντικότητα

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της αμυλάσης στον ορό εκτελείται τις περισσότερες φορές για τη διάγνωση και τη θεραπεία παθήσεων του παγκρέατος.

Ιστορικό μεθόδου

Η αμυλάση μετρήθηκε ποσοτικά για πρώτη φορά μέσω μιας ιωδομετρικής μεθόδου που παρουσιάστηκε από τον Wohlgemuth το 1908.¹ Ο Somogyi παρουσίασε μια διαδικασία το 1938 στην οποία τυποποιήθηκαν οι ποσότητες αμύλου και ιωδίου.² Το έργο του αποτέλεσε τη βάση για την ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο διάσπασης του αμύλου και τη σακχαρόγονο μέθοδο το 1956³ και το 1960,⁴ αντίστοιχα. Στα μειονεκτήματα αυτών των μεθόδων περιλαμβάνονται οι μεγάλοι χρόνοι επίτασης, η ενδογενής παρεμβολή της γλυκόζης και η αστάθεια των χρωμάτων της αντίδρασης που έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλή αναπαραγωγιμότητα και αξιοπιστία. Οι Rinderknecht et al παρουσίασαν το 1967 μια μέθοδο με άμυλο σύζευγμένο με χρωστική⁵ η οποία ήταν σχετικά απλή στην εκτέλεσή της. Ωστόσο, η διαδικασία χρησιμοποιούσε ένα αδιάλυτο υπόστρωμα, το οποίο δεν παρουσίαζε γραμμικότητα και εξακολουθούσε να απαιτεί φυγοκέντρηση ή διήθηση.

Έχουν παρουσιαστεί και θολωσιμετρικές διαδικασίες⁶ οι οποίες είναι σχετικά γρήγορες, αλλά απαιτούν ειδικά όργανα και παρουσιάζουν δυσκολίες στην παραγωγή σταθερών και αναπαραγωγίμων διαλυμάτων αμύλου. Έχουν προταθεί διάφορες ενζυμικές διαδικασίες^{7,8} συμπεριλαμβανομένης μίας που χρησιμοποιούσε καθορισμένο υπόστρωμα μαλτοτετραόζης.⁹ Οι μέθοδοι αυτές αποτέλεσαν σημαντική βελτίωση στις διαδικασίες μέτρησης της αμυλάσης, αλλά εξακολουθούσαν να έχουν σχετικά μεγάλους χρόνους πριν από την επίταση, είχαν πιθανότητες για ενδογενείς παρεμβολές γλυκόζης και μια σειρά από άλλες πιθανές παρεμβολές με τον σχημασμό NADH.¹⁰ Οι Wallenfeldt et al¹¹ παρουσίασαν τους p-νιτροφαινίλ γλυκοζίδες ως καθορισμένα υποστρώματα για τον προσδιορισμό α-αμυλάσης σε μια διαδικασία που εξάλειψε τις παρεμβολές από ενδογενή γλυκόζη και πυροσταφυλικό οξύ. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα ένζυμα σύζευξης για την υδρόλυση της βραχείας αλυσίδας ολιγοσακχαριτών που προκύπτουν από τη δραστηριότητα της αμυλάσης στο δείγμα. Δυστυχώς, αυτά τα ένζυμα σύζευξης παρουσίαζαν δραστηριότητα υπολειπόμενης αμυλάσης που επηρέαζε αρνητικά τη σταθερότητα αυτών των αντιδραστηρίων.

Η παρούσα μέθοδος βασίζεται στη χρήση ενός χρωματογόνου υποστρώματος, 2-χλωρο-p-νιτροφαινόλης συνδεδεμένης με μαλτοτριόζη. Η αντίδραση της αμυλάσης με αυτό το υπόστρωμα έχει ως αποτέλεσμα τον σχημασμό 2-χλωρο-p-νιτροφαινόλης, η οποία μπορεί να μετρηθεί φασματοφωτομετρικά στα 405 nm. Αυτή η αντίδραση εξελίσσεται πολύ γρήγορα, δεν απαιτούνται ένζυμα σύζευξης και η αντίδραση δεν αναστέλλεται άμεσα από ενδογενείς παράγοντες.

Αρχή

α-αμυλάση



Η α-αμυλάση υδrolύει την 2-χλωρο-p-νιτροφαινυλ-α-D-μαλτοτριοσίδη (CNP3) για την απελευθέρωση 2-χλωρο-p-νιτροφαινόλης και τον σχημασμό 2-χλωρο-p-νιτροφαινυλ-α-D-μαλτοσιδής (CNP2), μαλτοτριόζης (G3) και γλυκόζης (G). Ο ρυθμός αύξησης της απορροφητικότητας μετράται στα 405 nm και είναι ανάλογος της δραστηριότητας της α-αμυλάσης στο δείγμα.

Αντιδραστήρια

Ρυθμιστικό διάλυμα MES, pH 6,0±0,1, 2-Χλωρο-p-Νιτροφαινυλ-α-D-Μαλτοτριοσίδη 1,8 mM, χλωριούχο νάτριο 350 mM, οξικό ασβέστιο 6 mM, θεικασκάνιο κάλιο 900 mM, αζίδιο του νατρίου 0,1% (Βλ. "Προφυλάξεις").

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Το αντιδραστήριο παρέχεται ως έτοιμο για χρήση υγρό. Δεν απαιτείται προετοιμασία.

Αποθήκευση αντιδραστηρίων

- Φυλάσσετε το αντιδραστήριο σε θερμοκρασία 2 – 8°C.
- Το αντιδραστήριο παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης, εάν φυλάσσεται σύμφωνα με τις οδηγίες.

Αλλοίωση αντιδραστηρίου

Μην χρησιμοποιείτε το προϊόν εάν:

- Η απορρόφηση του αντιδραστηρίου εργασίας είναι μεγαλύτερη από 0,600 όταν μετράται στα 405 nm σε σχέση με νερό σε μια κυβέτα με μήκος διαδρομής 1 cm.
- Το αντιδραστήριο δεν πληροί τις αναφερόμενες παραμέτρους απόδοσης.
- Το αντιδραστήριο παρουσιάζει θολερότητα ή άλλη ένδειξη βακτηριακής μόλυνσης.

Προφυλάξεις

- Αυτό το kit αντιδραστηρίων προορίζεται μόνο για *in vitro* διαγνωστική χρήση.
- Αυτό το αντιδραστήριο περιέχει θεικασκάνιο κάλιο. ΔΗΛΗΤΗΡΙΟ. Απαγορεύεται η κατάποση.
- Αυτό το αντιδραστήριο περιέχει αζίδιο του νατρίου (0,1%) ως συντηρητικό. Απαγορεύεται η κατάποση. Μπορεί να αντιδράσει με τον μάλυβδο και τον χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων, σχηματίζοντας εξαιρετικά εκρηκτικά αζίδια μετάλλου. Κατά την απόρριψη, ξεπλύνετε με μεγάλη ποσότητα νερού ώστε να αποτραπεί η συσσώρευση αζιδίου.
- Όλα τα δείγματα και οι μάρτυρες πρέπει να αντιμετωπίζονται ως πιθανώς μολυσματικοί παράγοντες και ο χειρισμός τους πρέπει να γίνεται με ασφαλείς εργαστηριακές διαδικασίες. (NCCLS M29-T2)¹²

Συλλογή και χειρισμός δειγμάτων

- Προτιμάται η χρήση μη αιμολυμένου δείγματος ορού. Τα δείγματα πρέπει να συλλέγονται σύμφωνα με το έγγραφο NCCLS H4-A3.¹³
- Αντιπηκτικά, όπως το κηρικό και το EDTA, δεσμεύουν το ασβέστιο που είναι απαραίτητο για τη δραστηριότητα της αμυλάσης. Δεν πρέπει να χρησιμοποιείται πλάσμα που περιέχει αυτά τα αντιπηκτικά.
- Η αμυλάση στον ορό αναφέρεται σταθερή για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία δωματίου (18 – 25°C) και για δύο μήνες όταν φυλάσσεται υπό ψύξη σε θερμοκρασία 2 – 8°C.¹⁴

Αλληλεπιδράσεις

- Ορισμένα φάρμακα και ουσίες επηρεάζουν τον προσδιορισμό της αμυλάσης.^{15,16} Οι Young et al έχουν δημοσιολογήσει μια πλήρη λίστα τέτοιων ουσιών.¹⁷
- Η μακροαμυλάση στο δείγμα μπορεί να προκαλέσει μέτρηση μακροαμυλασαιμίας, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη διάγνωση αξείας παγκρεατίτιδας. Ωστόσο, με τη μακροαμυλασαιμία συνήθως δεν σχετίζονται κλινικά συμπτώματα.¹⁸
- Η χολερυθρίνη (30 mg/dL) και η αιμοσφαιρίνη (500 mg/dL) καταδείχθηκε ότι έχουν αμελητέα επίδραση σε αυτήν τη διαδικασία.
- Τα λαπαμικά δείγματα έως 1000 mg/dL έχει αναφερθεί ότι δεν έχουν επίδραση στους προσδιορισμούς αμυλάσης ορού.¹⁹

Παρεχόμενα υλικά

Αντιδραστήριο αμυλάσης (CNP3).

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Αναλυτής Yumizen C230/Yumizen C240
- Εγχειρίδιο λειτουργίας Yumizen C230/Yumizen C240
- Chemistry control, αριθμός καταλόγου C7592-100

Παράμετροι εξέτασης

Εξέταση:	AMY	Χημικό στοιχείο:	Αμυλάση
Χημικός αρ.:	204	Πλήρης ονομασία:	Αμυλάση
Τύπος αντίδρασης:	Κινητική	Κατεύθυνση αντίδρασης:	Θετική
Πρωτ. κύμα:	405 nm	Δευτ. Κύμα:	
Δεκαδικό:	0	Τύπος δείγματος/Ορός:	
Χρόνος τυφλού:		Χρόνος αντίδρασης:	3 11
Μονάδα:	U/L	Χρόνος επίτασης:	0

	Όγκος δείγματος	Αναρροφήθηκε	Αραιωτικό	Όγκος αντιδραστηρίου	Αραιωτικό
Πρότυπο,	5	uL	uL	UI	R1: 200
Μειωμένο,		uL	uL	uL	uL
Αυξημένο,		uL	uL	uL	uL

Εύρος γραμμικότητας (Πρότυπο),	0-2000	Όριο γραμμικότητας:	0.3
Εύρος γραμμικότητας (Μειωμένο):		Μείωση υποστρώματος:	25000
Εύρος γραμμικότητας (Αυξημένο):		Μικτή απορρόφηση τυφλού:	-40000 40000
Απορρόφηση τυφλού R1:	-40000 40000	Σταθερότητα επί του συστήματος:	30 Ημέρες
Απόκριση τυφλού	-40000 40000	Όριο συναγεμίου αντιδραστηρίου:	5
Διπλές χημείες:			

Έλεγχος προζώνης:		
Q1:	Q2:	Q3:
Q4:	PC:	ABS:

Χρήση ποσοτικού αποτελέσματος:	Εύρος:	Επίσημανση:
--------------------------------	--------	-------------

Μετατόπιση κλίσης:	Κλίση	Μετατόπιση	Μονάδα
	1	0	U/L

Σετ αντιδραστηρίων Pointe Amylase (CNPG3)

Προεργασία:		Προεργασία όγκου αντιδραστήριου:	uL
Προεργασία όγκου δείγματος:	uL		

Εύρος αναφοράς:		Εύρος αναφοράς:		Κρίσιμο εύρος:	Μονάδα:
Τύπος δείγματος:	Φύλο:	Εύρος ηλικίας:			

Παράμετροι ρύθμισης βαθμονόμησης

Χημ.: AMY	Βαθμονομητής:	Συγκ.	Θέση	Αρ. παρτίδας
Ρύθμιση βαθμονόμησης	Νερό	0,0	W	
Μαθηματικό μοντέλο: Παράγοντας K				
Συντελεστής: 3178,000	Επαναλήψεις: 2			
Αποδεκτά όρια				
Χρόνος βαθμ.: 24 ώρες				
Διαφ. κλίση: SD:				
Ευσαιθησία: Επαναληψιμότητα:				* Ορίζεται από τον χρήστη
Συντ. προσδ.: *				
Αυτόματη βαθμ.				
<input type="checkbox"/> Χρόνος βαθμ.				

Περιορισμοί

- Τα δείγματα που υπερβαίνουν το όριο γραμμικότητας (2000 U/L) πρέπει να αραιώνονται με ίσο όγκο φυσιολογικού ορού, να υποβάλλονται εκ νέου σε διαδικασία προσδιορισμού και τα αποτελέσματα πρέπει να πολλαπλασιάζονται δύο.
- Η μακροαμύλαση στο δείγμα μπορεί να προκαλέσει μέτρηση μακροαμυλασαιμίας, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένη διάγνωση οξείας παγκρεατίτιδας. Ωστόσο, με τη μακροαμυλασαιμία συνήθως δεν σχετίζονται κλινικά συμπτώματα.¹⁸

Βαθμονόμηση

Η διαδικασία τυποποιείται μέσω της χιλιοστομοριακής απορροφητικότητας της 2-χλωρο-ρ-νιτροφαινόλης που είναι 12,9 στα 405 nm υπό τις συνθήκες εξήτασης που περιγράφονται.

Υπολογισμοί (Παράδειγμα)

$$\frac{\Delta \text{Abs./min} \times \text{TV} \times 1000}{\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}} = \text{U/L} \alpha\text{-αμύλαση σε δείγμα}$$

Όπου: $\Delta \text{Abs./min}$ = Διαφορά απορρόφησης ανά λεπτό
 TV = Ολικός όγκος δοκιμασίας προσδιορισμού (1,025 mL)
 1000 = Μετατροπή U/mL σε U/L
 MMA = Χιλιοστομοριακή απορροφητικότητα της 2-χλωρο-ρ-νιτροφαινόλης (12,9)
 SV = Όγκος δείγματος (0,025 mL)
 LP = Διαδρομή φωτός (1 cm)

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

Παράδειγμα: Εάν $\Delta \text{Abs./min} = 0,03$, τότε $0,03 \times 3178 = 95 \text{ U/L}$

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η μετατροπή των μονάδων SI (nkat/L) γίνεται με τον πολλαπλασιασμό της τιμής U/L επί 16,67.

Ποιοτικές έλεγχοι

Η εγκυρότητα της αντίδρασης πρέπει να παρακολουθείται μέσω της χρήσης ορών μάρτυρα με γνωστές φυσιολογικές και μη φυσιολογικές τιμές αμύλασης. Οι μάρτυρες αυτοί πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση τουλάχιστον σε κάθε βάρδια στην οποία διενεργούνται δοκιμασίες προσδιορισμού αμύλασης. Συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθορίζει τη δική του συχνότητα προσδιορισμού με μάρτυρες. Πρέπει να καθιερωθούν απαιτήσεις ποιοτικού ελέγχου σε συμμόρφωση με τους τοπικούς, κρατικούς, ή/και ομοσπονδιακούς κανονισμούς ή τις απαιτήσεις πιστοποίησης.

Αναμενόμενες τιμές

Όρος: 25 – 125 U/L για περιφερική κινητική μέθοδο.²⁰ Καθώς οι αναμενόμενες τιμές επηρεάζονται από την ηλικία, το φύλο, τη διατροφή και τη γεωγραφική θέση, συνιστάται ιδιαίτερα κάθε εργαστήριο να καθορίζει το δικό του εύρος τιμών για αυτήν τη διαδικασία.

Επίδοση

- Γραμμικότητα: 0 – 2000 U/L
- Σύγκριση: Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε μεταξύ των αναλυτών της σειράς Yumizen 200 και παρόμοιου αναλυτή με παρόμοια μέθοδο, προέκυψε συντελεστής συσχέτισης 0,999 και εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης ήταν $y = 0,963x + 1,7$ (n = 33).

- Πιστότητα: Οι μελέτες ακριβείας εκτελέστηκαν με τη χρήση αναλυτή της σειράς Yumizen 200 βάσει μιας τροποποίησης των κατευθυντήριων οδηγιών που περιέχονται στο έγγραφο EP5-T2 της NCCLS.²¹

Εντός της ανάλυσης (n=20)			Ημερησίως (n=20)		
Μέση τιμή	S.D.	C.V.%	Μέση τιμή	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

- Ευσαιθησία: Η ευσαιθησία για το αντιδραστήριο αμύλασης διερευνήθηκε με μέτρηση της μεταβολής στην απορρόφηση ανά λεπτό στα 405 nm για ένα δείγμα φυσιολογικού ορού και για έναν ορό με γνωστή συγκέντρωση. Πραγματοποιήθηκαν δέκα επαναλήψεις από κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας κατέδειξαν ότι, στον αναλυτή που χρησιμοποιήθηκε, το αντιδραστήριο Liquid Amylase παρουσίασε μικρή ή καθόλου απόκλιση του αντιδραστήριου σε μηδενικό δείγμα. Υπό τις συνθήκες αντίδρασης που περιγράφηκαν, η δραστηριότητα 1 U/L ALT αποδίδει $\Delta \text{Abs./min}$ της τάξης του 0,0003.

Βιβλιογραφία

- 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 23:305 (1967).
- Zinterhofer, L., et al. Clin. Chem. Acta 435 (1973).
- Tietz, N.W., et al. Abs. of Proc. Of Intl Seminar and Workshop on Enzymology, Chicago, IL (May 1972).
- Schwara, H.W., Artzt. 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., AACCP Press (1989).
- Tietz, N.W., Clinical Guide to Laboratory Tests, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p. 54 (1983).
- Έγγραφο NCCLS "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2nd Ed. (1992).

Υπόμνημα συμβόλων

Χρήση έως (EEEE-MM-HH)	Παρτίδα και κωδικός παρτίδας
Αριθμός καταλόγου	Κατασκευαστής
In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν	Όρια θερμοκρασίας
Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης	Rx Only: Χρήση μόνο με ιατρική συνταγή
Σήμανση CE	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα

12-A7564-120	Παρασκευάζεται από HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand 5449 Research Drive, Canton, MI 48188		
--------------	---	--	--

<p>Παρασκευάζεται από την HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand 5449 Research Drive, Canton, MI 48188</p> <p>Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρώπη: Obelis s.a. Boulevard Général Wahis 53 1030 Brussels, ΒΕΛΓΙΟ Τηλ.: (32)2.732.59.54 Φαξ (32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net</p>	
--	--

Αντιδραστήρια πιστοποιημένα ως προς την απόδοση

Τα αντιδραστήρια της Pointe είναι πιστοποιημένα για παρασκευές σύμφωνα με καθορισμένες παραμέτρους. Οποιοδήποτε προϊόν αντιδραστήριου της Pointe δεν πληροί τις προδιαγραφές έως την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης του θα αποκαθίσταται αμέσως χωρίς χρέωση.