

Uso previsto

Determinazione cinetica quantitativa dell'attività dell' α -amilasi nel siero umano utilizzando gli analizzatori Yumizen C230 e Yumizen C240. **Solo su prescrizione.**

Interesse clinico

Le misurazioni dell'attività dell'amilasi nel siero vengono eseguite principalmente per la diagnosi e il trattamento delle pancreatiti.

Storia del metodo diagnostico

L'amilasi è stata misurata quantitativamente per la prima volta nel 1908, grazie a un metodo iodometrico introdotto da Wohlegemuth.¹ Nel 1938 Somogyi introdusse una procedura che standardizzava le quantità di amido e di iodio.² Il suo lavoro divenne la base per i metodi amiloclastici e saccarogenici, molto utilizzati, introdotti rispettivamente nel 1956³ e nel 1960⁴. Tra gli svantaggi di questi metodi spiccavano i lunghi tempi di incubazione, l'interferenza del glucosio endogeno e l'instabilità dei colori di reazione, fattori che comportavano scarsa riproducibilità e affidabilità. Nel 1967⁵, Rinderknecht et al. proposero un metodo che prevedeva l'uso di amido accoppiato a un colorante ed era relativamente semplice da eseguire. Tuttavia, la procedura utilizzava un substrato insolubile, mancava di linearità e richiedeva comunque la centrifugazione o la filtrazione.

Successivamente sono state introdotte procedure turbidimetriche⁶ relativamente veloci, ma che richiedono una strumentazione speciale e presentano difficoltà nel produrre soluzioni di amido stabili e riproducibili. Sono state, quindi, proposte diverse procedure enzimatiche^{7,8} tra cui una che utilizzava un substrato chiamato maltotetraosio.⁹ Questi metodi rappresentavano un miglioramento significativo nella misurazione dell'amilasi, ma erano ancora soggetti a tempi di pre-incubazione relativamente lunghi, a possibili interferenze del glucosio endogeno e a una serie di altre potenziali interferenze con la formazione di NADH.¹⁰ Wallenfels et al.¹¹ hanno introdotto l'utilizzo di p-nitrofenilglicosidi come substrati per la determinazione della α -amilasi in una procedura che ha eliminato l'interferenza di glucosio e piruvato endogeni. In questa procedura venivano utilizzati diversi enzimi di accoppiamento per idrolizzare gli oligosaccaridi a catena corta derivanti dall'attività amilasica del campione. Purtroppo, questi enzimi di accoppiamento contenevano un'attività amilasica residua che influiva negativamente sulla stabilità dei reagenti. Il metodo del nostro kit si basa sull'uso di un substrato **romogenico**, il 2-cloro-p-nitrofenolo legato al maltotriosio. La reazione dell'amilasi con questo substrato porta alla formazione di 2-cloro-p-nitrofenolo, che può essere misurato spettrofotometricamente a 405 nm. La reazione si svolge molto rapidamente, non sono necessari enzimi di accoppiamento e la reazione non è facilmente inibita da fattori endogeni.

Principio



L' α -amilasi idrolizza il 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotrioside (CNP3) per rilasciare il 2-cloro-p-nitrofenolo e formare 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltoside (CNP2), maltotriosio (G3) e glucosio (G). Il tasso di aumento dell'assorbanza viene misurato a 405 nm ed è proporzionale all'attività dell' α -amilasi nel campione.

Reagenti

Tampone MES, pH 6,0 \pm 0,1, 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotrioside 1,8 mM, cloruro di sodio 350 mM, acetato di calcio 6 mM, tiocianato di potassio 900 mM, sodio azide 0,1% (v. "Precauzioni").

Preparazione dei reagenti

I reagenti vengono forniti sotto forma di liquido pronto all'uso. Non è necessaria alcuna preparazione.

Conservazione dei reagenti

- Conservare a 2-8°C.
- Se conservati seguendo le raccomandazioni, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza.

Deterioramento dei reagenti

Non utilizzare il reagente se:

- l'assorbanza del reagente **iniziale** è superiore a 0,600 quando misurata a 405 nm in presenza di acqua in una provetta con un percorso di 1 cm.

- Il reagente non rispetta i parametri indicati.
- Il reagente è torbido o presenta altri segni di contaminazione batterica.

Precauzioni

- Il reagente può essere utilizzato esclusivamente a fini diagnostici *in vitro*.
- Il reagente contiene tiocianato di potassio. VELENO. Non ingerire.
- Il reagente contiene sodio azide (0,1%) come conservante. Non ingerire. Può reagire con piombo e rame e formare un complesso metallo-azide altamente esplosivo. Pertanto, per smaltire i residui del reagente occorre diluirli con abbondante acqua per evitare che l'azide si depositi.
- Tutti i campioni e i controlli devono essere trattati come potenzialmente infettivi, applicando procedure di laboratorio sicure. (NCCLS M29-T2)¹²

Raccolta e manipolazione dei campioni

- I campioni devono preferibilmente contenere siero non emolizzato. Devono essere raccolti secondo quanto indicato nel documento NCCLS H4-A3.¹³
- Gli anticoagulanti, come il citrato e l'EDTA, legano il calcio che è necessario per l'attività dell'amilasi. Non utilizzare plasma contenente questi anticoagulanti.
- L'amilasi nel siero è dichiarata stabile per una settimana se conservata a temperatura ambiente (18-25 °C) e per due mesi in frigorifero a 2-8 °C.¹⁴

Interferenze

- Numerosi farmaci e sostanze influenzano la misurazione dell'amilasi.^{15,16} Young et al. hanno pubblicato un elenco completo di queste sostanze.¹⁷
- La presenza di macroamilasi nel campione potrebbe comportare la rilevazione di un'iperamilasemia, che a sua volta potrebbe portare a diagnosticare erroneamente una pancreatite acuta. Tuttavia, generalmente nessun sintomo clinico risulta associato alla macroamilasemia.¹⁸
- È stato riscontrato che la bilirubina (30mg/dl) e l'emoglobina (500mg/dl) hanno un effetto trascurabile sulla procedura.
- È stato riscontrato che i campioni lipemici fino a 1000 mg/dl non hanno alcun effetto sulle misurazioni dell'amilasi sierica.¹⁹

Materiali in dotazione

Reagente per amilasi (CNP3).

Materiali necessari non in dotazione

- Analizzatori Yumizen C230 / Yumizen C240
- Manuale utente per gli analizzatori Yumizen C230 / Yumizen C240
- Controllo chimico, numero di catalogo C7592-100

Parametri di analisi

Analisi:	AMY	Sostanza chim.: Amilasi		
N. chim:	204	Nome etichetta: Amilasi		
Tipo reazione:	cinetica	Direzione reazione: positiva		
Lunghezza d'onda prim.:	405 nm	Lunghezza d'onda sec.		
Decimale:	0	Tipo campione: siero		
T. bianco:		T. reazione: 3 11		
Unità:	U/L	T. incubazione: 0		
Vol. campione	Aspirato	Diluite	Vol. reagente	Diluite
Standard; 5	ul	ul	ul R1: 200	ul
Decremento;	ul	ul	ul	ul
Incremento;	ul	ul	ul	ul
Intervallo linearità (standard); 0-2000	Limite linearità: 0.3			
Intervallo linearità (decremento):	Esaurim. substrato: 25000			
Intervallo linearità (incremento):	Assorb. bianco mix: - 40000 40000			
Assorb. bianco R1: - 40000 40000	Stabilità in macchina: 30 Giorni			
Risposta bianco - 40000 40000	Limite allarme reagente: 5			
Doppia chim.:				
Controllo eff. prozona:				
Q1:	Q2:	Q3:		
Q4:	PC:	ABS:		
Risultato qualitativo:				
Intervallo:		Val. fuori norma:		
Pendenza Offset:				
	Pendenza	Offset	Unità	
	1	0	U/L	

Kit reagenti Amilasi (CNP3) Pointe

Tratt. preliminare:	
Vol. campione pretratt.: ul	Vol. reagente pretratt.: ul

Intervallo rif.:					
Tipo campione:	Sesso:	Intervallo età:	Intervallo rif.:	Intervallo critico:	Unità:

Parametri di configurazione della calibrazione

Analisi chim.	AMY				
Impostazioni calibr.		Calibratore	Conc.	Pos.	N. lotto:
Modello mat.: Fattore K		acqua	0,0	W	
Fattore: 3178.000	Repliche: 2				
Limiti accettabilità					
T. calibr.:	24 h				
Diff. pendenza:	DS:				
Sensibilità:	Ripetibilità:				*Def. utente
Coeff. deter.:					
Auto Calib.	T. calibr.				

Limitazioni

- I campioni che superano il limite di linearità (2000 U/L) devono essere diluiti con pari volume di soluzione fisiologica, nuovamente analizzati e i risultati vanno moltiplicati per 2.
- La presenza di macroamilasi nel campione potrebbe comportare la rilevazione di un'iperamilasemia, che a sua volta potrebbe portare a diagnosticare erroneamente una pancreatite acuta. Tuttavia, generalmente nessun sintomo clinico risulta associato alla macroamilasemia.¹⁸

Calibrazione

La procedura è standardizzata per mezzo dell'assorbività millimolare del 2-cloro-p-nitrofenolo che è di 12,9 a 405 nm nelle condizioni di analisi descritte.

Calcolo (esempio)

$$\frac{\Delta \text{Abs./min} \times \text{TV} \times 1000}{\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}} = \text{U/l di } \alpha\text{-amilase nel campione}$$

con: $\Delta \text{Abs./min}$ = differenza di assorbanza al minuto
 TV = volume totale di analisi (1,025 ml)
 1000 = conversione di U/ml in U/L
 MMA = assorbività millimolare del 2-cloro-p-nitrofenolo (12,9)
 SV = volume del campione (0,025 ml)
 LP = percorso luce (1 cm)

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

Esempio: se $\Delta \text{Abs./min} = 0,03$, allora $0,03 \times 3178 = 95 \text{ U/L}$

NOTA: per convertire in unità del SI (nkat/L), moltiplicare U/L per 16,67.

Controllo qualità

La bontà della reazione va monitorata utilizzando sieri di controllo con valori normali e patologici noti di amilasi. I controlli vanno eseguiti in ogni turno in cui si effettuano analisi dell'amilasi. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca la frequenza interna dei controlli. Il controllo qualità richiesto va eseguito in conformità con le normative locali, statali e/o federali o ai requisiti di accreditamento.

Valori attesi

Siero. 25-125 U/L per un metodo cinetico analogo.²⁰ Poiché i valori attesi variano in funzione di età, sesso, alimentazione, area geografica, si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca il proprio intervallo di riferimento per la procedura.

Prestazioni

- Linearità: 0-2.000 U/L
- Comparazione: è stato condotto uno studio comparativo tra la serie Yumizen C200 e un analizzatore con metodo simile. Si è ottenuto un coefficiente di correlazione di 0,999 e un'equazione di regressione di $y=0,963x + 1,7$ (n=33)

- Precisione: gli studi sulla precisione sono stati condotti seguendo una modifica delle linee guida contenute nel documento EP5-T2 dell'istituto NCCLS utilizzando un analizzatore Yumizen 200 serie.²¹

Intra saggio (n=20)

Media	D.S.	C.V.%
50,4	2,3	4,5
537,0	17,0	3,2

Inter-giorn. (n=20)

Media	D.S.	C.V.%
64,6	20	4,7
425,6	12,1	2,8

- Sensibilità: la sensibilità di questo reagente è stata studiata leggendo la variazione dell'assorbanza al minuto a 405 nm per un campione di soluzione fisiologica e per campioni di siero con concentrazioni note. Sono state eseguite dieci repliche per ogni campione. I risultati di questa indagine hanno indicato che, sull'analizzatore utilizzato, il reagente liquido per amilasi ha mostrato una deriva del reagente minima o nulla sul campione zero. Nelle condizioni di reazione descritte, l'attività di 1 U/L di amilasi dà un $\Delta \text{Abs./min.}$ di 0,0003.

Riferimenti bibliografici

- 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).

Legenda

Utilizzare entro (aaaa-mm-gg)	LOT Codice lotto e gruppo
REF N. catalogo	Fabbricante
IVD Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	Limiti di temperatura
Consultare il manuale utente prescrizione	Rx Only: utilizzare solo su

12-A7561-100



Prodotto da
HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand
5449 Research Drive Canton, MI 48188

Prodotto da HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Rappresentante autorizzato per l'Europa:

Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53

1030 Bruxelles, BELGIO

tel: (32)2.732.59.54 fax:(32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net

Reagenti certificati

I reagenti Pointe sono certificati per essere stati prodotti conformemente ai parametri specificati. Se entro la data di scadenza un reagente Pointe dovesse risultare non conforme alle specifiche, sarà prontamente sostituito senza alcun addebito.