

Przeznaczenie

Do ilościowego oznaczania kinetycznego aktywności β -amylazy w surowicy ludzkiej za pomocą analizatorów Yumizen C230 i Yumizen C240. **Rx Only.**

Znaczenie kliniczne

Oznaczanie aktywności amylazy w surowicy jest najczęściej wykonywane w diagnostyce i leczeniu chorób trzustki.

Metoda

Amylazę po raz pierwszy zmierzono ilościowo metodą jodometryczną wprowadzoną przez Wohlegemutha w 1908 r.¹ Somogyi wprowadził w 1938 r. procedurę standaryzującą ilości skrobi i jodu.² Jego praca stała się podstawą szeroko stosowanych metod amyloklastycznych i sacharogennych wprowadzonych w 1956 r.³ i 1960 r.,⁴ odpowiednio. Wady tych metod obejmowały długie czasy inkubacji, endogenną interferencję glukozy i niestabilne kolory reakcji, co skutkowało słabą odtwarzalnością i niezawodnością.

Rinderknecht i wsp. wprowadzili w 1967⁵ metodę ze skrobią sprzężoną z barwnikiem, która była stosunkowo prosta do wykonania. Jednak procedura wykorzystywała nierozpuszczalny substrat, brakowało jej liniowości i nadal wymagała wirowania lub filtracji.

Wprowadzono procedury turbidymetryczne⁶, które są stosunkowo szybkie, ale wymagają specjalnego oprzyrządowania i utrudniają wytwarzanie stabilnych i powtarzalnych roztworów skrobi.

Zasugerowano kilka procedur enzymatycznych^{7,8}, w tym jedną, która wykorzystywała określony substrat maltotetraozę.⁹ Metody te stanowiły znaczną poprawę w pomiarze amylazy, ale nadal podlegały stosunkowo długim czasom wstępnej inkubacji, możliwej endogennej interferencji glukozy i szeregowi innych potencjalnych zakłóceń w powstawaniu NADH.¹⁰

Wallenfels i wsp.¹¹ wprowadzili p-nitrofenyloglikozydy jako zdefiniowane substraty do oznaczania amylazy w procedurze, która eliminuje interferencję endogennej glukozy i pirogonianu. Do hydrolizy krótkołańcuchowych oligosacharydów powstałych w wyniku aktywności amylazy w próbce zastosowano wiele enzymów sprzęgających. Niestety, te enzymy sprzęgające zawierały resztkową aktywność amylazy, która niekorzystnie wpływała na stabilność tych odczynników.

Niniejsza metoda opiera się na zastosowaniu chromogenicznego substratu, 2-chloro-p-nitrofenolu połączonego z maltotriozą. W wyniku reakcji amylazy z tym substratem powstaje 2-chloro-p-nitrofenol, który można zmierzyć spektrofotometrycznie przy długości fali 405 nm. Ta reakcja przebiega bardzo szybko, nie są wymagane żadne enzymy sprzęgające, a reakcja nie jest łatwo hamowana przez czynniki endogenne.

Zasada metody

- amylaza



-Amylaza hydrolizuje 2-chloro-p-nitrofenylo-D-maltotriozyd (CNP3), uwalniając 2-chloro-nitrofenol i tworząc 2-chloro-p-nitrofenylo- -D-maltozyd (CNP2), maltotriozę (G3) i glukozę (G). Szybkość wzrostu absorbancji mierzona jest przy 405 nm i jest proporcjonalna do aktywności β -amylazy w próbce.

Odczynniki

Bufor MES, pH 6,0+0,1, 2-chloro-p-nitrofenylo- -D-maltotriozyd 1,8 mM, chlorek sodu 350 mM, octan wapnia 6 mM, tiocyjanian potasu 900 mM, azydek sodu 0,1% (patrz „Środki ostrożności”).

Przygotowanie odczynnika

Odczynnik dostarczany jest w postaci gotowej do użycia cieczy. Nie jest wymagane żadne przygotowanie.

Przechowywanie odczynnika

- Przechowywać odczynnik w temperaturze 2-8°C.
- Odczynnik jest stabilny do daty ważności, jeśli jest przechowywany zgodnie z zaleceniami.

Degradacja odczynnika

Nie używać, jeśli:

- Absorbancja odczynnika roboczego jest większa niż 0,600, gdy jest mierzona przy długości fali 405 nm względem wody w kuwecie o długości drogi optycznej 1 cm.
- Odczynnik nie spełnia podanych parametrów działania.
- Odczynnik jest mętny lub wykazuje inne oznaki zanieczyszczenia bakteriynego.

Środki ostrożności

- Ten zestaw odczynników jest przeznaczony wyłącznie do użytku w diagnostyce in vitro.
- Ten odczynnik zawiera tiocyjanian potasu. ZATRUĆ. Nie spożywać.
- Ten odczynnik zawiera azydek sodu (0,1%) jako środek konserwujący. Nie spożywać. Może reagować z ołowianymi i miedzianymi instalacjami wodociągowymi, tworząc wysoce wybuchowe azydki metali. Po usunięciu splukać dużą ilością wody, aby zapobiec gromadzeniu się azydki.
- Wszystkie próbki i kontrole należy traktować jako potencjalnie zakaźne, stosując bezpieczne procedury laboratoryjne. (NCCLS M29-T2)¹²

Pobieranie i przechowywanie próbek

- Próbką z wyboru jest surowica niehemolizowana. Próbki należy pobierać zgodnie z dokumentem NCCLS H4-A3.¹³
- Antykoagulanty, takie jak cytrynian i EDTA, wiążą wapń potrzebny do aktywności amylazy. Nie należy stosować osocza zawierającego te antykoagulanty.
- Amylaza w surowicy jest stabilna przez tydzień w temperaturze pokojowej (18-25°C) i przez dwa miesiące, gdy jest przechowywana w lodówce w temperaturze 2-8°C.¹⁴

Interferencje

- Wiele leków i substancji wpływa na oznaczanie amylazy.^{15,16} Young i wsp. opublikowali obszerną listę takich substancji.¹⁷
- Makroamylaza w próbce może powodować mierzoną hiperamylazemię, co może prowadzić do błędnego rozpoznania ostrego zapalenia trzustki. Jednakże makroamylazemia zwykle nie wiąże się z żadnymi objawami klinicznymi.¹⁸
- Stwierdzono, że bilirubina (30 mg/dl) i hemoglobina (500 mg/dl) mają znikomy wpływ na tę procedurę.
- Zgłaszano, że próbki lipemiczne do 1000 mg/dl nie mają wpływu na oznaczenia amylazy w surowicy.¹⁹

Materiały zapewnione

Odczynnik amylazy (CNP3).

Materiały wymagane ale niedostarczane

- Analizator Yumizen C230 / Yumizen C240
- Instrukcja obsługi Yumizen C230 / Yumizen C240
- Kontrola chemiczna, numer katalogowy C7592-100

Parametry testu

Test:	AMY	Nazwa chem:	Amylaza
Numer.:	204	Wydruk:	Amylaza
Typ reakcji:	Kinetyczna	Kierunek reakcji:	Rosnąca
Pri. Wave:	405 nm	Dł. Fali II	
Miejsca dziesiętne.:	0	Typ próbki:	Surowica
Próba ślepa:		Cykl reakcji:	3 11
Jednostka:	U/L	Cykl inkubacji:	0

	Obj. próbki.	Aspiracja	Rozcieńczalnik	Obj. odczynnika	Rozcieńczalnik
Prawidłowa:	5	uL	uL	uL R1: 200	uL uL
Zmniejszona:		uL	uL	uL	
Zwiększona:		uL	uL	uL	

Zakres liniowości (Prawidłowy):	0-2000	Limit liniowości:	0.3
Zakres liniowości (Zmniejszony):		Zużycie substratu:	25000
Zakres liniowości (Zwiększony):		Mieszana abs. próby	- 40000 40000
Abs. R1/próba ślepa:	- 40000 40000	Stabilność na pokładzie:	30 dni
Próba ślepa:	- 40000 40000	Reagent Alarm Limit:	5
Chemia bliźniacza:			

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

Użyj wyniku jakościowego:
Zakres: Flagi:

Przesunięcie i nachylenie	Przesunięcie	Nachylenie	Jednostka
	1	0	U/L

