

Utilizarea prevăzută

Pentru determinarea cantitativă cinetică a activității α -amilazei în serul uman cu ajutorul analizatoarelor Yumizen C230 și Yumizen C240. **Rx Only.**

Semnificația clinică

Determinarea activității amilazei în ser se efectuează cel mai frecvent pentru diagnosticarea și tratamentul bolilor pancreatice.

Istoricul metodei

Amilaza a fost măsurată cantitativ prima dată printr-o metodă iodometrică introdusă de Wohlegemuth în 1908.¹ În 1938, Somogyi a introdus o procedură care a standardizat cantitățile de amidon și iod.² Activitatea sa a devenit baza pentru metodele amiloclastice și zaharogene, utilizate pe scară largă, introduse în 1956.³ și respectiv 1960.⁴ Dezavantajele acestor metode au inclus timpi lungi de incubare, interferența endogenă a glucozei și culorii de reacție instabile care duc la reproductibilitate și fiabilitate slabe.

În 1967, Rinderknecht et al au introdus o metodă pe bază de amidon combinat cu un colorant⁵ relativ simplu de efectuat. Cu toate acestea, procedura utiliza un substrat insolubil, era lipsită de linearitate și necesita în continuare centrifugare sau filtrare.

Au fost introduse proceduri turbidimetrice⁶ care sunt relativ rapide, dar necesită instrumente speciale și prezintă dificultăți în producerea unor soluții de amidon stabile și reproductibile.

Au fost sugerate mai multe proceduri enzimactice^{7,8}, inclusiv una care utiliza substratul definit maltotetraoză.⁹ Aceste metode au reprezentat îmbunătățiri semnificative în măsurarea amilazei, dar aveau încă timpi de pre-încubare relativ lungi, posibile interferențe endogene ale glucozei și o serie de alte interferențe potențiale cu formarea NADH.¹⁰

Wallenfels et al¹¹ au introdus p-nitrofenil-glicozidele ca substraturi definite pentru determinarea α -amilazei într-o procedură care a eliminat interferența glucozei endogene și a piruvatului. O varietate de enzime de cuplare au fost utilizate pentru a hidroliza oligozaharidele cu lanț scurt rezultate din activitatea amilazei din specimen. Din păcate, aceste enzime de cuplare conțineau o activitate a amilazei reziduale care a afectat negativ stabilitatea acestor reactivi.

Prezenta metodă se bazează pe utilizarea unui substrat de cromagen, 2-cloro-p-nitrofenol legat cu maltotrioză. Reacția amilazei cu acest substrat duce la formarea de 2-cloro-p-nitrofenol, care poate fi măsurat spectrofotometric la 405 nm. Această reacție decurge foarte rapid, nu sunt necesare enzime de cuplare și reacția nu este ușor inhibată de factori endogeni.

Principiul

α -amilaza

10 CNPG3 -----> 9 CNP + CNPG2 + 9G3 + G

α -Amilaza hidrolizează 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriozida (CNPG3), eliberând 2-cloro-p-nitrofenol și formând 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltozidă (CNPG2), maltotrioză (G3) și glucoză (G). Creșterea vitezei absorbantei este măsurată la 405 nm și este proporțională cu activitatea α -amilazei din probă.

Reactivi

Soluția tampon MES, pH 6,0 \pm 0,1, 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriozidă 1,8 mM, clorură de sodiu 350 mM, acetat de calciu 6 mM, tiocianat de potasiu 900 mM, azidă de sodiu 0,1% (Consultați secțiunea „Precauții”).

Prepararea reactivului

Reactivul este furnizat sub formă de lichid gata de utilizare. Nu este necesară nicio preparare.

Depozitarea reactivului

1. Depozitați reactivul la 2-8°C.
2. Dacă este depozitat conform instrucțiunilor, reactivul este stabil până la data de expirare.

Deteriorarea reactivului

Nu utilizați dacă:

1. Absorbanta reactivului de lucru este mai mare de 0,600 atunci când este măsurată la 405 nm față de apă într-o cuvă cu o cale cu lungimea de 1 cm.
2. Reactivul nu îndeplinește parametri de performanță specificați.
3. Reactivul este tulbure sau prezintă alte indicii de contaminare bacteriană.

Precauții

1. Acest set de reactivi este doar pentru diagnostic *in vitro*.
2. Acest reactiv conține tiocianat de potasiu. **OTRAVĂ.** A nu se ingera.
3. Acest reactiv conține azidă de sodiu (0,1%) drept conservant. A nu se ingera. Poate reacționa cu cuprul sau plumbul, formând azide metalice foarte explozive. La eliminare, spălați cu multă apă pentru a preveni acumularea azidei.
4. Toate specișenele și soluțiile de control trebuie manipulate ca potențial infecțioase, folosind proceduri de laborator sigure. (NCCLS M29-T2)¹²

Recoltarea și manevrarea specișenelor

1. Serul nehemolizat este specișenul preferat. Specișenele trebuie recoltate conform documentului NCCLS H4-A3.¹³
2. Anticoagulantele, cum ar fi citratul și EDTA, leagă calciul necesar pentru activitatea amilazei. Nu trebuie utilizată plasmă cu aceste anticoagulante.
3. Amilaza din ser este raportată stabilă timp de o săptămână la temperatura camerei (18-25°C) și timp de două luni dacă este depozitată la frigider 2-8°C.¹⁴

Interacțiuni

1. O serie de medicamente și substanțe afectează determinarea amilazei.^{15,16} Young et al au publicat o listă cuprinzătoare a acestor substanțe.¹⁷
2. Macroamilaza din specișen poate provoca o hiperamilazemie măsurată, care poate duce la un diagnostic fals de pancreatită acută. Cu toate acestea, de obicei nu există simptome clinice asociate cu macroamilazemia.¹⁸
3. S-a constatat că bilirubina (30 mg/dL) și hemoglobina (500 mg/dL) au un efect neglijabil asupra acestei proceduri.
4. S-a raportat că probele lipemice până la 1000 mg/dL nu au niciun efect asupra determinărilor amilazei serice.¹⁹

Materiale furnizate

Reactiv amilază (CNPG3).

Materiale necesare, dar nefurnizate

1. Analizorul Yumizen C230 / Yumizen C240
2. Manualul de utilizare al analizorului Yumizen C230 / Yumizen C240
3. Soluție de control chimic, număr catalog C7592-100

Parametrii testului

Test:	AMY	Chimie:	Amilază
Nr. chimie:	204	Denumire:	Amilază
Tip reacție:	Cinetică	Direcție reacție:	Pozitivă
Undă primară:	405 nm	Undă Undă	
Zecimal:	0	Tip probă:	Ser
Timp martor:		Timp reacție:	3 11
Unitate:	U/L	Timp de incubare:	0

	Vol. probă	Aspirat	Diluant	Vol. reactiv	Diluant	
Standard;	5	uL	uL	R1: 200	uL	uL
Redus;		uL	uL	uL		
Crescut;		uL	uL	uL		

Interval linearitate (Standard):	0-2000	Limită linearitate:	0.3
Interval linearitate (Redus):		Depleția substratului:	25000
Interval linearitate (Crescut):		Absorbanta martor amestecat:	- 40000 40000
Absorbanta martor R1:	- 40000 40000	Stabilitate în instrument:	30 Zi (zile)
Reacție martor	- 40000 40000	Limită de alarmă reactiv:	5
Chimie twin:			

Verificare prozonă:		
Q1:	Q2:	Q3:
Q4:	PC:	ABS:

Utilizare rezultat cantitativ:		
Interval:		Marcaj:

Decalaj pantă:			
Decalaj		pantă	Unitate
1		0	U/L

Pointe Amylase (CNP3) Set de reactivi

Tratare prealabilă:
Vol. probă pretratată: uL Vol. reactiv pretratat: uL

Interval de referință:
Tip probă: Sex: Interval de vârstă: Interval de referință: Interval critic: Unitate:

Parametri configurare calibrare

Chem:	AMY	Soluție de calibrare	Conc.	Poz	Nr. lot
Setare calibrare		Apă	0,0	W	
Model matematic:	Factor K				
Factor:	3178,000	Replici:	2		
Limite de acceptanță					
Timp Cal:	24 hr.				
Dif. pantă:	SD:				
Sensibilitate:	Repetabilitate:				* Definit de utilizator
Coef. Deter:					
Calib. automată					
	<input type="checkbox"/> Timp Cal				

Limitări

- Probele cu valori care depășesc limita de linearitate (2000 U/L) trebuie diluate cu un volum egal de soluție salină și testate din nou, înmulțind rezultatul cu doi.
- Macroamilaza din specimen poate provoca o hiperamilazemie măsurată, care poate duce la un diagnostic fals de pancreatită acută. Cu toate acestea, de obicei nu există simptome clinice asociate cu macroamilazemia.¹⁸

Calibrarea

Procedura este standardizată cu ajutorul absorbției milimolare a 2-cloro-p-nitrofenol, care este 12,9 la 405 nm în condițiile de testare specificate.

Calcul (Exemplu)

$$\frac{\Delta \text{Abs./min} \times \text{TV} \times 1000}{\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}} = \text{U/L } \alpha\text{-amilază în probă}$$

Unde: $\Delta \text{Abs./min}$ = Diferența absorbției pe minut
 TV = Volumul total de testare (1,025 mL)
 1000 = Conversia U/mL în U/L
 MMA = Absorbția milimolară a 2-cloro-p-nitrofenol (12,9)
 SV = Volumul probei (0,025 mL)
 LP = Calea luminii (1 cm)

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

Exemplu: Dacă $\Delta \text{Abs./min} = 0,03$, atunci $0,03 \times 3178 = 95 \text{ U/L}$

NOTĂ: Pentru a transforma unitățile SI (nKat/L), înmulțiți valoarea U/L cu 16,67.

Controlul calității

Validitatea reacției trebuie monitorizată prin utilizarea serurilor de control cu valori normale și anormale cunoscute ale amilazei. Aceste soluții de control trebuie procesate cel puțin o dată în fiecare tură de lucru în care se efectuează teste de amilază. Recomandăm insistent ca fiecare laborator să își stabilească propria frecvență de determinare a soluției de control. Cerințele privind controlul calității trebuie stabilite în conformitate cu reglementările locale, statale și/sau federale sau cu cerințele de acreditare.

Valori așteptate

Ser: 25-125 U/L pentru o metodă cinetică similară.²⁰ Deoarece valorile așteptate sunt afectate de vârstă, sex, alimentație și locație geografică, se recomandă insistent ca fiecare laborator să-și stabilească propriul interval de referință pentru această procedură.

Performanță

- Linearitate: 0-2,000 U/L
- Comparație: S-a realizat un studiu comparativ între analizoarele din seria Yumizen 200 și un analizor și o metodă similară, având ca rezultat un

coeficient de corelare de 0,999 și o ecuație de regresie liniară $y=0,963 x + 1,7$ (n=33).

- Precizie: S-au realizat studii de precizie pe analizoarele din seria Yumizen 200, în urma unei modificări a liniilor directe incluse în documentul NCCLS EP5-T2.²¹

În cadrul ciclului de procesare (n=20)

Media	S.D.	C.V.%	De la o zi la alta (n=20)	Media	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	

- Sensibilitate: Sensibilitatea față de reactivul amilază a fost investigată prin măsurarea modificării absorbției pe minut la 405 nm pentru o probă de soluție salină și un ser cu concentrație cunoscută. S-au efectuat zece repetări pentru fiecare probă. Rezultatele acestei investigații au arătat că, pe analizorul utilizat, reactivul amilază lichidă a prezentat o abatere redusă sau nicio abatere a reactivului pe o probă blank. În condițiile de reacție descrise, activitatea 1 U/L amilază duce la o $\Delta \text{Abs./Min.}$ de 0,0003.

Referințe

- 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).
- Documentul NCCLS „Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue”, Ediția a 2-a (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).
- Documentul NCCLS „Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices”, Ed. a 2-a (1992).

Legendă simboluri

A se utiliza până la (AAAA-LL-ZZ)	Cod lot și serie
Număr catalog	Producător
Dispozitiv medical pentru diagnostic <i>in vitro</i>	Limită de temperatură
Consultați instrucțiunile de utilizare	
Numai pentru utilizare pe bază de prescripție medicală	
Marcaj CE	Reprezentant autorizat în Comunitatea Europeană

12-A7564-120

Produs de
HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand
5449 Research Drive Canton, MI 48188



Produs de HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Reprezentant autorizat în Europa:

Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53

1030 Bruxelles, BELGIA

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



Certificat pentru efectuarea reactivilor

Reactivii Pointe sunt certificați ca fiind fabricați în conformitate cu parametrii specificați. Orice produs reactiv Pointe care nu îndeplinește specificațiile prin data de expirare indicată va fi remediat imediat fără niciun cost suplimentar.