

Utilisation

Pour la détermination cinétique quantitative de l'activité α -amylase dans le sérum humain à l'aide de l'analyseur Yumizen C560. **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 1960,⁴ 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.

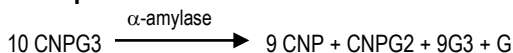
Des procédures turbidimétriques ont été introduites⁶ qui sont relativement rapides mais qui nécessitent une instrumentation spéciale et ont du mal à produire des solutions d'amidon stables et reproductibles.

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 l'échantillon. 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 hydrolyse le 2-chloro-p-nitrophényl- α -D-maltotrioside (CNP3) pour libérer le 2-chloro-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 \pm 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 et stabilité des réactifs

Conserver le réactif entre 2 et 8 °C. Le réactif est stable jusqu'à la date d'expiration s'il est stocké selon les directives. Une fois placé dans le carrousel de réactifs réfrigérés (2-10°C), le réactif est stable pendant 30 jours.

Détérioration du réactif

Ne pas utiliser si :

1. 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.
2. Le réactif ne répond pas aux paramètres de performance indiqués.
3. Le réactif est trouble ou présente d'autres signes de contamination bactérienne.

Précautions et dangers

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

Risques :

Classifications des dangers : Dangereux pour le milieu aquatique, danger à long terme, catégorie 4

Mentions de danger : H413 : Peut causer des effets nocifs à long terme sur la vie aquatique.

Conseils de prudence : **Prévention :** P273 : Éviter les rejets dans l'environnement. P280 : Porter des gants de protection/des vêtements de protection/une protection oculaire. **Réponse :** P391 : Recueillir les déversements. Dangereux pour le milieu aquatique. **Stockage :** P404 :

Conserver dans un contenant fermé. **Disposition :** P501 : Éliminer le contenu dans une usine d'élimination des déchets agréée. **Reportez-vous à la fiche de données de sécurité de ce produit (FDS-A)7564) disponible en composant le 1-734-487-8300.**



Pointe Amylase (CNP3) Kit réactifs

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

Matériel fourni

Réactif amylase (CNP3).

Matériel requis mais non fourni

1. Yumizen C560 Analyseur et manuel d'utilisation
2. Contrôle de chimie, numéro de catalogue C7592-100

Limites

1. 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.
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

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.

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

1. Plage de dosage : 1-2,000 U / L
2. Comparaison : Une étude a été réalisée entre le Yumizen C560 et un analyseur et une méthode similaires, ce qui a donné les résultats suivants :

Méthode	Amylase
N	85
Moyenne Amylase (U/L)	127.2
Plage de valeurs (U/L)	9-1856
Écart type	257.0
Équation de régression	$y = 0.964x - 6.5$
Coefficient de corrélation	0.9981

3. Précision : Des études de précision ont été réalisées à l'aide de l'analyseur Yumizen C560 à la suite d'une modification des lignes directrices contenues dans le document EP5-T2 du NCCLS. ²¹

Échantillon	Sur une journée		
	LOW	MID	HIGH
N	20	20	20
Moyenne	237.9	679.9	1918.5
Écart type	0.9	6.8	6.1
Coefficient de Variation (%)	0.4%	1.0%	0.3%

Échantillon	Total		
	LOW	MID	HIGH
N	40	40	40
Moyenne	242.9	558.6	1988.0
Écart type	6.3	17.2	37.6
Coefficient de Variation (%)	2.6%	3.1%	1.9%

4. Sensibilité : 2SD limite de détection (95% Conf) = 1 U / L

Références

1. Wohlegemuth, J., Bio Chem. 29:1 (1908).
2. Somogyi, M., J. Biol Chem. 125:399 (1938).
3. Street, H.V., Close, J.R., Clin Chim Acta 1:256 (1956).
4. Henry, R.J., Chiamori, N., Clin. Chem. 6:434 (1960).
5. Rinderknecht, H.P., et al, Experientia 23:805 (1967).
6. Zinterhofer, L., et al, Clin. Chem. Acta 43:5 (1973).
7. Tietz, N.W., et al, Abs. of Proc. Of Int'l Seminar and Workshop on Enzymology, Chicago, IL (May 1972).
8. Schiwara, H.W., Artzl. Lab 17:340 (1971).
9. Pierre, K.J., et al, Clin. Chem. 22:1219 (1976).
10. Kaufman, R.A., Tietz, N.W., Clin. Chem. 26:7:851 (1980).
11. Wallenfels, K., et al, Carbohydrate Research 61:359 (1978).

12. NCCLS document "Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue", 2nd Ed. (1991).
13. NCCLS document "Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Skin Puncture", 3rd Ed. (1991).
14. Tietz, N.W. Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp. 725-734 (1986).
15. Elking, M.P., Kabot, H.J., Amer. J. Hosp. Pharm. 25:485 (1968).
16. Bogoch, A., et al, Gastroenterology 26:697 (1954).
17. Young, D.S., et al, Clin Chem 21:1D (1975).
18. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p. 627 (1982).
19. Young, D.S. and Friedman, D.S., Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests, 2nd Ed., AACC Press (1989).
20. Tietz, N.W., Clinical Guide to Laboratory Tests, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p. 54 (1983).
21. NCCLS document "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2nd Ed. (1992).

PARAMETRES CHIMIE

Chem:	AMYL	No.:	204	Sample Type:	Serum
Chemistry:	Amylase			Print Name:	AMYL
Reaction Type:	Kinetic			Reaction Direction:	Positive
Pri Wave:	412			Sec Wave:	
Unit:	U/L			Decimal	0
Blank Time:	0	0		Reaction Time:	19 33
	Sample Vol.	Aspirated	Diluent	Reagent Vol.	Diluent
Standard:	3.0 ul	--- ul	--- ul	R1: 120 ul	--- ul
Decreased:	--- ul	--- ul	--- ul	R2: --- ul	-- ul
Increased:	--- ul	--- ul	--- ul	R3: --- ul	-- ul
	<input type="checkbox"/> Sample Blank	<input checked="" type="checkbox"/> Auto Rerun		R4: --- ul	--- ul
<u>Slope/Offset Adjustment</u>					
Slope: 1		Offset: 0			

Linearity Range (Standard)	1	2000	Linearity Limit:	0.3
Linearity Range (Decreased)	---	---	Substrate Depletion:	25000
Linearity Range (Increased)	---	---	Mixed Blank Abs:	
R1 Blank Abs:	---	---	Uncapping Time	
Blank Response:	---	---	Reagent Alarm Limit:	
Twin Chemistry:			<input type="checkbox"/> Enzyme Linear Extension	
<input type="checkbox"/> Prozone Check		<input type="radio"/> Rate Check	<input type="radio"/> Antigen Addition	
Q1:	Q2:	Q3:	Q4:	
PC:	ABS:			

Pointe Amylase (CNPG3) Kit réactifs

PARAMETRES d'étalonnage

Calibrator Definition						
Calibrator:	*		Lot No.:	*		
Exp Date:	*					
Carousel		Pos				
Sample Carousel 1		*				
Sample Carousel 2						
Sample Carousel 3						
Reagent/Calibration						
<u>Calibrator</u>	<u>Pos</u>	<u>Lot No</u>	<u>Exp Date</u>	<u>Chem</u>	<u>Conc</u>	<u>Unit</u>
Water	W	*	*	AMYL	0	U/L
Calibration Setup						
Chem:	AMYL					
Calibration Settings						
Math Model:	K Factor					
Factor:	3178	Replicates:	1			
Acceptance Limits						
Cal Time:	24	Hour				
Slope Diff:	---	SD:	---			
Sensitivity :	---	Repeatability:	---			
Deter Coeff:	---					
Auto Calib.						
<input type="checkbox"/> Bottle Changed	<input type="checkbox"/> Lot Changed	<input type="checkbox"/> Cal Time				

Il est recommandé que deux niveaux de matériel témoin soient analysés quotidiennement.
* Indique un paramètre défini par l'utilisateur.

REF 14-A7564-120



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



Réactifs certifiés

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

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



Symboles



Use by (YYYY-MM-DD)



Lot and batch code



Catalog number



Manufacturer



Temperature limitation



Consult instructions for use



In vitro diagnostic medical device

Rx Only: Prescription Use Only

Rev. 11/23

P803-A7564-560-FR