

Kit reagenti Amilasi (CNPG3) Pointe

Usò previsto

Determinazione cinetica quantitativa dell'attività dell' α -amilasi nel siero umano utilizzando l'analizzatore Yumizen C560. **Solo su prescrizione.**

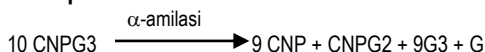
Interesse clinico

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 cromogenico, 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 (CNPG3) per rilasciare il 2-cloro-nitrofenolo e formare 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltoside (CNPG2), 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 e stabilità dei reagenti

Conservare i reagenti a 2-8°C. Se conservati seguendo le raccomandazioni, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza. Dopo essere stati inseriti nell'apposito caricatore refrigerato (2-10°C), i reagenti restano stabili per 30 giorni.

Deterioramento dei reagenti

Non utilizzare il reagente se:

1. 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.
2. Il reagente non rispetta i parametri indicati.
3. Il reagente è torbido o presenta altri segni di contaminazione batterica.

Precauzioni e pericoli

1. Il reagente è destinato esclusivamente a fini diagnostici *in vitro*.
2. 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.
3. Tutti i campioni e i controlli devono essere trattati come potenzialmente infettivi, applicando procedure di laboratorio sicure. (NCCLS M29-T2)¹²

Pericoli:

Classificazione dei pericoli: Pericoloso per l'ambiente acquatico, pericolo a lungo termine, Categoria 4

Indicazioni di pericolo: H413: Può essere nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

Consigli di prudenza: **Prevenzione:** P273: Non disperdere nell'ambiente. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi. **Reazione:** P391:

Raccogliere la fuoriuscita. Pericoloso per l'ambiente acquatico. **Conservazione:** P404: Conservare in un recipiente chiuso. **Smaltimento:** P501: Smaltire il prodotto presso un impianto di smaltimento autorizzato. **Consultare la Scheda di sicurezza del prodotto (SDS-A7564) disponibile chiamando il numero: 1-734-487-8300.**



Parola segnaletica:

Raccolta e manipolazione dei campioni

1. I campioni devono preferibilmente contenere siero non emolizzato. Devono essere raccolti secondo quanto indicato nel documento NCCLS H4-A3.¹³ **Attenzione**
2. 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.
3. 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

1. Numerosi farmaci e sostanze influenzano la misurazione dell'amilasi.^{15,16} Young et al. hanno pubblicato un elenco completo di queste sostanze.¹⁷

Kit reagenti Amilasi (CNP3) Pointe

- 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

- Analizzatore Yumizen C560 con manuale utente
- Controllo chimico, numero di catalogo C7592-100

Limitazioni

- I campioni che superano il limite di linearità (2000 U/L) vanno 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.

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.

- Intervallo di analisi: 1-2.000 U/L
- Comparazione: è stato condotto uno studio comparativo tra l'impiego dell'analizzatore Yumizen C560 e di un analizzatore e un metodo simili. I risultati sono riportati nella tabella sottostante:

Metodo	Amilasi
N	85
Amilasi media (U/l)	127,2
Intervallo (U/l)	9-1856
Deviazione standard	257,0
Analisi di regressione	$y = 0,964x - 6,5$
Coefficiente di correlazione	0,9981

- Precisione: gli studi sulla precisione sono stati condotti seguendo una modifica delle linee guida contenute nel documento EP5-T2 dell'istituto NCCLS e utilizzando l'analizzatore Yumizen C560.²¹

Campione	Intra-giom.			Totale		
	BASSA	MEDIA	ALTA	BASSA	MEDIA	ALTA
N	20	20	20	40	40	40
Media	237,9	679,9	1918,5	242,9	558,6	1988,0
Deviazione standard	0,9	6,8	6,1	6,3	17,2	37,6
Coefficiente di variazione (%)	0,4%	1,0%	0,3%	2,6%	3,1%	1,9%

- Sensibilità: 2SD limite di rilevabilità (95% conf) = 1 U/L

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).

Kit reagenti Amilasi (CNP3) Pointe

21. NCCLS document "Evaluation of Precision

 Performance of Clinical Chemistry Devices", 2nd Ed. (1992).

PARAMETRI CHIMICI

Analisi chim.:	AMYL	N.	204	Tipo campione:	Siero
Denominazione:	Amilasi			Nome etichetta:	AMYL
Tipo reazione:	cinetica			Direzione reazione:	positiva
Lungh. d'onda prim.:	412			Lungh d'onda sec.:	
Unità:	U/L			Decimale	0
T. bianco:	0	0		T. reazione:	19 33
	Vol. campione	Aspirato	Diluente	Vol. reagente	Diluente
Standard:	3.0 ul	--- ul	--- ul	R1:	120 ul --- ul
Decremento:	--- ul	--- ul	--- ul	R2:	--- ul -- ul
Incremento:	--- ul	--- ul	--- ul	R3:	--- ul -- ul
	<input type="checkbox"/> Bianco Camp.	<input checked="" type="checkbox"/> Ripetiz. Automat.		R4:	--- ul --- ul
<u>Pendenza/ Offset</u>					
	Pendenza: 1	Offset: 0			

Intervallo linearità (standard)	1	2000	Limite linearità:	0.3
Intervallo linearità (decremento)	---	---	Esaurim. substrato:	25000
Intervallo linearità (incremento)	---	---	Assorb bianco mix:	
Assorb bianco R1:	---	---	T. apertura	
Risp. bianco:	---	---	Limite allarme reag.:	
Doppia chim.:			<input type="checkbox"/> Est. Lineare enzimi	
<input type="checkbox"/> Controllo eff. prozona		<input type="radio"/> Controllo livello	<input type="radio"/> Aggiunta antigene	
Q1:	Q2:	Q3:	Q4:	
PC:	ABS:			

Kit reagenti Amilasi (CNP3) Pointe

PAMETRI DI CALIBRAZIONE

Definizione calibratore						
Calibratore:	*			N. lotto:	*	
Data di scadenza:	*					
Caricatore						
		Pos.				
Caricatore campione 1		*				
Caricatore campioni 2						
Caricatore campioni 3						
Reagente/calibrazione						
<u>Calibratore</u>	<u>Pos.</u>	<u>N. lotto</u>	<u>Data scad.</u>	<u>Analisi</u>	<u>Conc.</u>	<u>Unità</u>
Acqua	W	*	*	AMYL	0	U/L
Configurazione calibrazione						
Analisi chim.		AMYL				
<u>Impostazioni calibr.</u>						
Modello mat.:	fattore K					
Fattore:	3178		Repliche:	1		
<u>Limiti accettabilità</u>						
T. calibr.:	24		h			
Diff. pendenza:	---		DS:	---		
Sensibilità:	---		Ripetibilità:	---		
Coef. deter.:	---					
<u>Auto Calib.</u>						
<input type="checkbox"/> Cambio flacone	<input type="checkbox"/> Cambio lotto		<input type="checkbox"/> Ora cal.			

Si raccomanda di analizzare quotidianamente due livelli di materiale di controllo.

* Indica un parametro definito dall'utente.

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.

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

Legenda

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