

## Przeznaczenie

Do ilościowego oznaczania kinetycznego aktywności  $\alpha$ -amylazy w surowicy ludzkiej za pomocą analizatora Yumizen C560. **Rx Only.**

## Znaczenie kliniczne

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

## Historia metody

Amylazę po raz pierwszy zmierzono ilościowo metodą jodometryczną wprowadzoną przez Wohlegemutha w 1908 r.<sup>1</sup> Somogyi wprowadził w 1938 r. procedurę standaryzującą ilość skrobi i jodu.<sup>2</sup> Jego praca stała się podstawą szeroko stosowanych metod amyloklasyfikacyjnych i sacharogennych wprowadzonych w 19563 i 1960 r.,<sup>4</sup> 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 1967<sup>5</sup> 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.

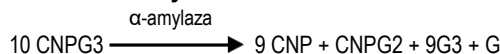
Wprowadzono procedury turbidymetryczne<sup>6</sup>, które są stosunkowo szybkie, ale wymagają specjalnego oprzyrządowania i utrudniają wytwarzanie stabilnych i powtarzalnych roztworów skrobi.

Zasugerowano kilka procedur enzymatycznych<sup>7,8</sup>, w tym jedną, która wykorzystywała określony substrat maltotetraozę.<sup>9</sup> 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.<sup>10</sup>

Wallenfels i wsp.<sup>11</sup> wprowadzili p-nitrofenyloglikozydy jako zdefiniowane substraty do oznaczania  $\alpha$ -amylazy w procedurze, która wyeliminowała interferencję z endogennej glukozy i pirogronianu. 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



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

## Odczynniki

Bufor MES, pH 6,0+0,1, 2-chloro-p-nitrofenylo- $\alpha$ -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 i stabilność odczynnika

Przechowywać odczynnik w temperaturze 2-8°C. Odczynnik jest stabilny do daty ważności, jeśli jest przechowywany zgodnie z zaleceniami. Po umieszczeniu w schłodzonej karuzeli z odczynnikiem (2-10°C), odczynnik jest stabilny przez 30 dni.

## Pogorszenie jakości odczynnika

Nie używać, jeśli:

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

## Środki ostrożności i zagrożenia

1. Ten zestaw odczynników jest przeznaczony wyłącznie do użytku w diagnostyce in vitro.
2. 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 spłukać dużą ilością wody, aby zapobiec gromadzeniu się azydku.
3. Wszystkie próbki i kontrole należy traktować jako potencjalnie zakaźne, stosując bezpieczne procedury laboratoryjne. (NCCLS M29-T2)<sup>12</sup>

## Zagrożenia:

Klasyfikacja zagrożeń: zagrożenie dla środowiska wodnego, zagrożenie długotrwałe, kategoria 4

Zwroty wskazujące rodzaj zagrożenia: H413: Może powodować długotrwałe szkodliwe skutki dla organizmów wodnych.

Zwroty wskazujące środki ostrożności: Zapobieganie: P273: Unikać uwolnienia do środowiska. P280: Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu.

Reagowanie: P391: Zebrać wyciek. Niebezpieczny dla środowiska wodnego. Przechowywanie: P404: Przechowywać w zamkniętym pojemniku.

Usuwanie: P501: Zawartość usunąć do zatwierdzonego zakładu utylizacji odpadów. Zapoznaj się z kartą charakterystyki tego produktu (SDS-A7564) dostępną pod numerem telefonu 1-734-487-8300.



**Hasło ostrzegawcze:**  
**Ostrzeżenie**

## Pobieranie i przechowywanie próbek

1. Próbką z wyboru jest niezemolizowana surowica. Próbkę należy pobierać zgodnie z dokumentem NCCLS H4-A3.<sup>13</sup>
2. Antykoagulanty, takie jak cytrynian i EDTA, wiążą wapń potrzebny do aktywności amylazy. Nie należy stosować osocza zawierającego te antykoagulanty.
3. 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.<sup>14</sup>

## Interferencje

1. Szereg leków i substancji wpływa na oznaczanie amylazy.<sup>15,16</sup> Young i wsp. opublikowali obszerną listę takich substancji.<sup>17</sup>

# Pointe Amylase (CNPG3) Reagent Set

2. Makroamylaza w próbce może powodować mierzoną hiperamylazemię, co może prowadzić do fałszywego rozpoznania ostrego zapalenia trzustki. Jednakże makroamylazemia zwykle nie wiąże się z żadnymi objawami klinicznymi.<sup>18</sup>
3. Stwierdzono, że bilirubina (30 mg/dl) i hemoglobina (500 mg/dl) mają znikomy wpływ na tę procedurę.
4. Zgłoszono, że próbki lipemiczne do 1000 mg/dl nie mają wpływu na oznaczenia amylazy w surowicy.<sup>19</sup>

## Materiały wymagane

Amylase (CNPG3) reagent.

## Materiały wymagane, niedostarczane

1. Analizator Yumizen C560 I instrukcja obsługi
2. Chemisty control, numer katalogowy C7592-100

## Ograniczenia

1. Próbkę przekraczającą granicę liniowości (2000 U/L) należy rozcieńczyć taką samą objętością roztworu soli fizjologicznej, ponownie oznaczyć i pomnożyć wynik przez dwa.
2. Makroamylaza w próbce może powodować mierzoną hiperamylazemię, która może prowadzić do fałszywego rozpoznania ostrego zapalenia trzustki. Jednak zwykle makroamylazemii nie towarzyszą żadne objawy kliniczne.<sup>18</sup>

## Kalibracja

Procedura jest standaryzowana za pomocą milimolowej absorpcji 2-chloro-p-nitrofenolu, która wynosi 12,9 przy 405 nm w warunkach badania opisanych.

## Kontrola jakości

Ważność reakcji należy monitorować, stosując surowice kontrolne ze znanymi prawidłowymi i nieprawidłowymi wartościami amylazy. Kontrole te należy przeprowadzać co najmniej na każdej zmianie roboczej, podczas której wykonywane są testy amylazy. Zaleca się, aby każde laboratorium ustaliło własną częstotliwość oznaczania kontroli. Kontrole jakości należy przeprowadzać zgodnie z lokalnymi, stanowymi i/lub federalnymi przepisami lub wymaganiami dotyczącymi akredytacji.

## Wartości oczekiwane

Surowica: 25-125 U/L dla podobnej metody kinetycznej.<sup>20</sup> Ponieważ na oczekiwane wartości mają wpływ wiek, płeć, dieta i położenie geograficzne, zdecydowanie zaleca się, aby każde laboratorium ustaliło swój własny zakres referencyjny dla tej procedury.

## Wydajność

1. Zakres pomiarowy: 1-2,000 U/L
2. Porównanie: przeprowadzono badanie pomiędzy Yumizen C560 a podobnym analizatorem i metodą, w wyniku czego otrzymano następujące dane:

Metoda	Amylaza
N	85
Średnia (U/L)	127.2
Zakres (U/L)	9-1856
Odchylenie standardowe	257.0
Regresja	$y = 0.964x - 6.5$
Współczynnik korelacji	0.9981

3. Precyzja: Badania precyzji przeprowadzono za pomocą analizatora Yumizen C560 po modyfikacji wytycznych zawartych w dokumencie NCCLS EP5-T2.<sup>21</sup>

Próbka	W ciągu dnia		
	NISKIE	SREDNIE	WYSOKIE
N	20	20	20
Średnia	237.9	679.9	1918.5
Odchylenie standardowe	0.9	6.8	6.1
Współczynnik wariancji (%)	0.4%	1.0%	0.3%

Próbka	Całkowita		
	NISKIE	SREDNIE	WYSOKIE
N	40	40	40
Średnia	242.9	558.6	1988.0
Odchylenie standardowe	6.3	17.2	37.6
Współczynnik wariancji (%)	2.6%	3.1%	1.9%

4. Czulość: granica wykrywalności 2 SD (95% Conf)= 1 U/L

## Piśmiennictwo

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).



