

## Utilizarea prevăzută

Pentru determinarea cantitativă a  $\alpha$ -amilazei în serul uman cu ajutorul analizorului Yumizen C560. **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.<sup>1</sup> În 1938, Somogyi a introdus o procedură care a standardizat cantitățile de amidon și iod.<sup>2</sup> Activitatea sa a devenit baza pentru metodele amiloclastice și zaharogene, utilizate pe scară largă, introduse în 1956.<sup>3</sup> și respectiv 1960.<sup>4</sup> Dezavantajele acestor metode au inclus timpi lungi de incubare, interferența endogenă a glucozei și culori 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 colorant<sup>5</sup> relativ simplu de efectuat. Cu toate acestea, procedura utilizează un substrat insolubil, era lipsită de linearitate și necesita în continuare centrifugare sau filtrare.

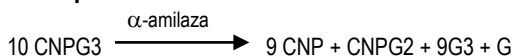
Au fost introduse proceduri turbidimetrice<sup>6</sup> care sunt relativ rapide, dar necesită instrumente speciale și prezintă dificultăți în producerea unor soluții de amidon stabile și reproductibile.

Au fost sugerate mai multe proceduri enzimice<sup>7,8</sup>, inclusiv una care utilizează substratul definit maltotetraoză.<sup>9</sup> Aceste metode au reprezentat îmbunătățiri semnificative în măsurarea amilazei, dar aveau încă timpi de pre-incubare relativ lungi, posibile interferențe endogene ale glucozei și o serie de alte interferențe potențiale cu formarea NADH.<sup>10</sup>

Wallenfels et al<sup>11</sup> au introdus p-nitrofenil-glicozidele ca substraturi definite pentru determinarea  $\alpha$ -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



$\alpha$ -Amilaza hidrolizează 2-cloro-p-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltotriozida (CNP3), eliberând 2-cloro-nitrofenol și formând 2-cloro-p-nitrofenil- $\alpha$ -D-maltozidă (CNP2), maltotrioză (G3) și glucoză (G). Viteza de creștere a absorbției este măsurată la 405 nm și este proporțională cu activitatea  $\alpha$ -amilazei din probă.

## Reactivi

Soluție tampon MES, pH 6,0±0,1, 2-cloro-p-nitrofenil- $\alpha$ -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 și stabilitatea reactivilor:

Depozitați reactivul la 2-8°C. Dacă este depozitat conform instrucțiunilor, reactivul este stabil până la data de expirare. Dacă este amplasat în caruselul pentru reactivi refrigerat (2-10°C), reactivul este stabil timp de 30 de zile.

## Deteriorarea reactivului

Nu utilizați dacă:

1. Absorbția 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 parametrii de performanță specificați.
3. Reactivul este tulbure sau prezintă alte indicii de contaminare bacteriană.

## Precauții și pericole

1. Acest set de reactivi este doar pentru diagnostic *in vitro*.
2. 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.
3. Toate speciile și soluțiile de control trebuie manipulate ca potențial infecțioase, folosind proceduri de laborator sigure. (NCCLS M29-T2)<sup>12</sup>

## Pericole:

**Clasificarea pericolelor:** Periculos pentru mediul acvatic, pericol pe termen lung, Categoria 4

**Fraze de pericol:** H413: Poate provoca efecte nocive de lungă durată asupra vieții acvatice.

**Fraze de precauție:** **Prevenirea:** P273: Evitați eliberarea în mediu. P280: Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/protecție pentru ochi.

**Reacția:** P391: Colectați scurgerile de produs. Periculos pentru mediul acvatic. **Depozitarea:** P404: Depozitați într-un recipient închis. **Eliminarea:** P501:

Aruncați conținutul la o stație aprobată de eliminare a deșeurilor. **Consultați fișa cu date de securitate a acestui produs (SDS-A7564)**

disponibilă prin apel la 1-734-487-8300.

## Recoltarea și manevrarea speciilor

1. Serul nehemolizat este specimenul preferat. Speciile trebuie recoltate conform documentului NCCLS H4-A3.<sup>13</sup>
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.<sup>14</sup>



**Cuvânt de avertizare:**  
Avertizare

# Pointe Amylase (CNP3)

## Set de reactivi

### Interacțiuni

1. O serie de medicamente și substanțe afectează determinarea amilazei.<sup>15,16</sup> Young et al au publicat o listă cuprinzătoare a acestor substanțe.<sup>17</sup>
2. 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.<sup>18</sup>
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.<sup>19</sup>

### Materiale furnizate

Reactiv amilază (CNP3).

### Materiale necesare, dar nefurnizate

1. Analizorul Yumizen C560 și Manualul de utilizare
2. Soluție de control chimic, număr catalog C7592-100

### Limitări

1. 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.
2. 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.<sup>18</sup>

### 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.

### 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.<sup>20</sup> 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

1. Interval test: 1-2,000 U/L
2. Comparație: S-a realizat un studiu comparativ între Yumizen C560 și un analizor și o metodă similară, cu următoarele rezultate:

Metodă	Amilază
N	85
Amilaza medie (U/L)	127,2
Interval (U/L)	9-1856
Abaterea standard	257,0
Analiza regresiei	$y = 0.964x - 6.5$
Coefficient de corelare	0,9981

3. Precizie: S-au realizat studii de precizie pe analizorul Yumizen C560, în urma unei modificări a liniilor directe incluse în documentul NCCLS EP5-T2.<sup>21</sup>

Probă	În cursul zilei		
	REDUSĂ	MEDIE	RIDICATĂ
N	20	20	20
Medie	237,9	679,9	1918,5
Abaterea standard	0,9	6,8	6,1
Coefficient de variație (%)	0,4%	1,0%	0,3%

Probă	Total		
	REDUSĂ	MEDIE	RIDICATĂ
N	40	40	40
Medie	242,9	558,6	1988,0
Abaterea standard	6,3	17,2	37,6
Coefficient de variație (%)	2,6%	3,1%	1,9%

4. Sensibilitate: 2 SD limita de detecție (CI 95%) = 1 U/L

### Referințe

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

**PARAMETRI CHIMICI**

Chem:	AMYL	Nr.:	204	Tip probă:	Ser
Chimie:	Amilază			Denumire:	AMYL
Tip reacție:	Cinetică			Direcție reacție:	Pozitiv
Undă primară:	412			Undă secundară:	
Unitate:	U/L			Zecimal	0
Timp martor:	0	0		Timp reacție:	19 33
	Volum probă	Aspirat	Diluant	Volum reactiv	Diluant
Standard:	3.0 uL	-- uL	-- uL	R1:	120 uL -- uL
Redus:	-- uL	-- uL	-- uL	R2:	-- uL -- uL
Crescut:	-- uL	-- uL	-- uL	R3:	-- uL -- uL
	<input type="checkbox"/> Probă martor	<input checked="" type="checkbox"/> Reprocesare automată		R4:	-- uL -- uL
<b>Ajustare pantă/decalaj</b>					
Pantă: 1		Decalaj: 0			

Interval linearitate (Standard)	1	2000	Limită linearitate:	0,3
Interval linearitate (Redus)	---	---	Depleția substratului:	25000
Interval linearitate (Crescut)	---	---	Absorbanță martor amestecat:	
Absorbanță martor R1:	---	---	Timp fără capac	
Reacție martor:	---	---	Limită de alarmă reactiv:	
Chimie twin:			<input type="checkbox"/> Extensie enzimatică liniară	
<input type="checkbox"/> Verificare prozonă		<input type="radio"/> Verificare viteză	<input type="radio"/> Adăugare antigen	
Q1:	Q2:	Q3:	Q4:	
PC:	ABS:			

