

L α - AMYLÁZA

Diagnostická reagensie pro kvantitativní in vitro stanovení α -amylázy v séru, plazmě nebo moči fotometricky.

Katalogové číslo:

10252	500 ml	(5 x 80 ml + 1 x 100 ml)
10253	100 ml	(5 x 16 ml + 1 x 20 ml)

Shrnutí^{1,2}:

α -amylázy jsou hydrolytické enzymy, které rozkládají škrob na maltózu. V lidském těle vznikají α -amylázy v různých orgánech: pankreatickou amylázu produkuje slinivka břišní a uvolňuje ji do střevního traktu, slinná amyláza se syntetizuje ve slinných žlázách a vylučuje se do slin. Amyláza, která je přítomna v krvi, se eliminuje přes ledviny a vylučuje se do moči. Proto zvýšená sérová aktivita odráží vzestup aktivity močové amylázy.

Měření α -amylázy v séru a moči se používá zejména pro diagnózu poruchy slinivky břišní a rovněž pro sledování vývoje komplikací. Při akutním zánětu slinivky břišní se činnost amylázy v krvi zvýší v průběhu několika hodin po nástupu bolesti v břišní krajině, vrcholí asi po 12 hodinách a vrací se na hodnoty referenčního rozpětí nejpozději do pěti dnů. Specifická α -amyláza pro poruchy slinivky břišní není příliš vysoká, protože zvýšené hodnoty bývají rovněž měřeny i u různých jiných nepankreatických onemocnění, např. při parotitidě a renální insuficienci. Proto se za účelem potvrzení akutní pankreatitidy doporučuje ještě dodatečné měření hodnot lipázy.

Metoda:

Enzymatické fotometrické stanovení, ve kterém je substrát 4, 6-ethyliden-(G7)-4-nitrofenyl-(G1)- α -D-maltoheptaosid (EPS-G7) štěpen α -amylázou na různé fragmenty. Ty jsou v druhém kroku hydrolyzovány α -glukosidázou za vzniku glukózy a 4-nitrofenolu. Nárůst absorbance představuje celkovou aktivitu amylázy (pankreatické a slinné) ve vzorku^{3,4}.

Princip:

α -amyláza

5 EPS-G7 + 5 H₂O → 2-ethyliden-G5 + 2 G24-NP + 2-ethyliden-G4 + 2 G34-NP + ethyliden-G3 + G4-4-NP

α -glukosidáza

2 G2-4-NP + 2 G3-4-NP + G4-4-NP + 14 H₂O → 5 4-NP + 14 G

4-NP: 4-nitrofenol

G: Glukóza

EPS-G7: 4,6-ethyliden-(G7)-4-nitrofenyl-(G1)- α -D-maltoheptaosid

Reagensie:

Složení a koncentrace

R1:

GOOD pufr	pH 7,15	0,1 mol/l
NaCl		62,5 mmol/l
MgCl ₂		12,5 mmol/l
α -glukosidáza		≥33,3 μ kat/l

R2:

GOOD pufr	pH 7,15	0,1 mol/l
EPS-G7		8,5 mmol/l

Skladování a stabilita:

Diagnostické použití in vitro.

Reagensie, skladované při 2-8°C, jsou stabilní do konce měsíce deklarovaného data na balení. Chránit před světlem a zabránit kontaminaci. Reagensie nezamrazovat.

Příprava reagenčních roztoků:

1. Start substrátem: Činidla R1 a R2 jsou připravena k okamžitému použití a skladované při 2-8°C jsou stabilní do konce měsíce deklarovaného data na balení, uchovávat ve tmě. Reagensie nezamrazovat.

2. Start vzorkem: Činidla smíchat v poměru 4 + 1 (např. 20 ml R1 + 5 ml R2), směsné činidlo je stabilní 6 měsíců při 2-8°C nebo 4 týdny při 15-25°C. Monoreagent chránit před světlem.

Další potřebné materiály:

NaCl roztok 9 g/l

Obecné laboratorní vybavení.

Vzorek:

Sérum, plazma (heparin), moč.

Stabilita v séru nebo plazmě⁵:

7 dní	při 20 - 25°C
7 dní	při 4 - 8°C
1 rok	při - 20°C

Stabilita v moči⁵:

2 dny	při 20 - 25°C
10 dní	při 4 - 8°C
3 týdny	při - 20°C

Vzorky lze zamrazit pouze jednou.

Nutno zabránit kontaminaci vzorku.

Pracovní postup:

Aplikace pro automatické analyzátoři je dostupná na vyžádání.

Vlnová délka: Hg 405 nm

Kyveta: 1 cm

Teplota: 37°C

Měření: proti reagenčnímu blanku

1. Start substrátem:

	Vzorek/ml	Standard/ml	Blank/ml
Vzorek	0,02 (moč 0,01)	-	-
Dest. voda	-	-	0,02 (moč 0,01)
Standard	-	0,02 (moč 0,01)	-
R1	1,00	1,00	1,00

Promíchat a přibližně 1 minutu inkubovat, přidat:

R2	0,25	0,25	0,25
----	------	------	------

Promíchat a po 2 minutách (37°C) změřit počáteční absorbanci (A_s , A_{st} , A_{bl}) a začít měřit čas a přesně po 1, 2 a 3 minutách změřit absorbance (A_s , A_{st} , A_{bl}). Vypočítat průměrnou $\Delta A/\text{min}$.

2. Start vzorkem:

	Vzorek/ml	Standard/ml	Blank/ml
Vzorek	0,02 (moč 0,01)	-	-
Dest. voda	-	-	0,02 (moč 0,01)
Standard	-	0,02 (moč 0,01)	-
R1 + R2	1,00	1,00	1,00

Promíchat a po 2 minutách (37°C) změřit počáteční absorbanci (A_s , A_{st} , A_{bl}) a začít měřit čas. Přesně po 1, 2 a 3 minutách změřit absorbance (A_s , A_{st} , A_{bl}). Vypočítat průměrnou $\Delta A/\text{min}$.

Výpočet:

$$C_{\text{amylasy}} = C_{\text{st}} \cdot (\Delta A_s/\text{min} - \Delta A_{bl}/\text{min}) / (\Delta A_{st}/\text{min} - \Delta A_{bl}/\text{min}) \quad [\mu\text{kat/l}]$$

C_{st} katalytická koncentrace standardu uvedená v atestu
[$\mu\text{kat/l}$]

A_s absorbance vzorku

A_{st} absorbance standardu

A_{bl} absorbance blanku

Výsledek se vydá v $\mu\text{kat/l}$ na 2 platná desetinná místa.

Kalibrace:

Ke kalibraci je doporučen kalibrátor Biocal (k.č. C00.003). Přímá návaznost kalibrátoru je na originální formulaci IFCC (molárního absorpčního koeficient), koncentrace byla stanovena s celkovou nejistotou $U_{\text{cal}} = 2,46\%$.

Řízení kvality:

Pro vnitřní kontrolu kvality platí doporučení ČSKB SIKK, které je dostupné na webové stránce <http://www.cskb.cz> a pro externí hodnocení kvality je třeba využít některý komerčně dostupný systém, jehož výsledky jsou v ČR akceptovány. Bližší informace na <http://www.sekk.cz>.

Pro vnitřní kontrolu kvality použijte kontrolní séra:

Bionorm U	kat.č. C00.001	20 x 5 ml
Biopath U	kat.č. C00.002	20 x 5 ml

Referenční hodnoty⁶:

	Ženy	Muži
Sérum/plazma	<1,67 $\mu\text{kat/l}$	<1,67 $\mu\text{kat/l}$
Moč	<7,45 $\mu\text{kat/l}$	<8,18 $\mu\text{kat/l}$

Každá laboratoř by si měla ověřit, jestli jsou tyto referenční hodnoty vhodné i pro jejich populaci pacientů a stanovit svoje vlastní referenční hodnoty pokud je to nutné.

Měřicí rozsah/linearita:

Na automatických analyzátořech je linearita do 33,4 $\mu\text{kat/l}$.

Při manuálním stanovení je linearita uvedena níže:

Pro sérum a plazmu:

0,05 – 33,1 $\mu\text{kat/l}$ pro start substrátem

0,05 – 26,6 $\mu\text{kat/l}$ pro start vzorkem

Pro moč:

0,05 – 65,6 $\mu\text{kat/l}$ pro start substrátem

0,05 – 52,6 $\mu\text{kat/l}$ pro start vzorkem

Funkční senzitivita/mez stanovitelnosti:

0,05 $\mu\text{kat/l}$

Analytická senzitivita/citlivost:

0,025 $\mu\text{kat/l}$

Analytická selektivita:

Kyselina askorbová do 1,7 mmol/l, bilirubin do 684 $\mu\text{mol/l}$ a lipémie do 11 mmol/l triacylglycerolů neruší stanovení. Hemoglobin interferuje od 5,5 g/l. Více informací o interferujících látkách naleznete v Young DS⁷.

Přesnost:

Přesnost v sérii: (n=20)

Vzorek	Průměr $\mu\text{kat/l}$	SD $\mu\text{kat/l}$	CV %
vzorek 1	3,06	0,033	1,08
vzorek 2	6,63	0,045	0,67
vzorek 3	14,02	0,083	0,59

Přesnost ze dne na den: (n=20)

Vzorek	Průměr $\mu\text{kat/l}$	SD $\mu\text{kat/l}$	CV %
vzorek 1	3,0	0,03	1,01
vzorek 2	6,38	0,062	0,97
vzorek 3	13,62	0,125	0,92

Srovnání metod:

Srovnání stanovení mezi diagnostickou soupravou BioVendor $^1\alpha$ - Amyláza (y) a doporučenou rutinní metodou⁵ (x) bylo provedeno na 51 vzorcích. Rovnice regresní přímky má tvar $y = 0,964x - 0,04 \mu\text{kat/l}$; $r = 0,998$.

Srovnání stanovení mezi diagnostickou soupravou BioVendor $^1\alpha$ - Amyláza (y) a komerčně dostupnou soupravou (x) bylo provedeno na 51 vzorcích. Rovnice regresní přímky má tvar $y = 1,031x - 0,06 \mu\text{kat/l}$; $r = 0,994$.

Upozornění:

1. Při katalytické koncentraci vyšší než měřicí rozsah stanovení je nutno vzorek ředit 1 + 9 0,9% NaCl a výsledek násobit 10x.

2. Činidla obsahují azid sodný, nutno zabránit styku s pokožkou a sliznicemi.

3. Sliny a povrch kůže obsahují α -amylázu, nepipetovat ústy a zabránit kontaktu činidel s kůží.

4. Reagent 1 obsahuje biologický materiál zvířecího původu. Zacházejte s ním jako s potenciálně nebezpečným materiálem v souladu s pokyny správné laboratorní praxe.

5. Ve vzácných případech u pacientů s gamapathii se mohou vyskytnout falešné výsledky. [8]

6. Při práci s touto reagentií dodržujte nutná bezpečnostní opatření. Více informací naleznete v Bezpečnostním listu.

7. Pouze pro použití odborně vyškoleným personálem!

Literatura:

1. Lorentz K. a-Amylase. In: Thomas L, editor. Clinical laboratory diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft;1998,p.192-202.
2. Moss DW, Henderson AR. Digestive enzymes of pancreatic origin. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company;1999,p.689-98.
3. Kruse-Jarres JD, Kaiser C, Hafkenschied JC, Hohenwallner W, Stein W., Bohner J et al. Evaluation of a new alpha-amylase assay using 4,6-ethylidene-(G7)-1-4-nitrophenyl-(G1)-alpha-D-maltoheptaoside as substrate. J Clin Chem Biochem 1989;27:103-13.
4. Schumann G, Aoki R, Ferrero CA et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Clin Chem Lab Med 2006; 44(9): 1146-1155
5. Guder WG, Zawta B et al. The Quality of Diagnostic Samples. 1st ed. Darmstadt: GIT Verlag; 2001; p. 16-7, 50-1.
6. Junge W, Wortmann W, Wilke B, Waldenstroem J et al. Development and evaluation of assays for determination of total and pancreatic amylase at 37°C according to the principle recommended by the IFCC. Clin Biochem 2001; 34: 607-15.
7. Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 5th ed. Volume 1 and 2. Washington, DC: The American Association for Clinical Chemistry Press 2000.
8. Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assai: mechanism, detection and prevention. ClinChemLabMed 2007;45(9):1240-1243

Vyrobeno:

BioVendor – Laboratorní medicína a.s.
Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika