

AMILAZA

Metoda colorimetrica enzimatica
CINETIC

Numai pentru diagnostic in vitro

PRINCIPIUL

Cu aceasta metoda directa α -amilaza catalizeaza hidroliza substratului 2-clorid-p-nitrofenil-alpha-D-maltotriosid la un nivel de pH de 6.0 formand 2-cloro-p-nitrofenol (CNP) si glicozide libere. Reactia este monitorizata cinetic la 405 nm la rata de formare a CNP-ului colorat produs, proportional cu reactia produsa in proba de α -amilaza.

α -AMILASE



pH 6.0

CNP-G2 = 2-Chloro-nitrofenil – α –D-maltoside

G3 = Maltotrioza

G = Glucoza

COMPOZITIA REACTIVULUI

R1 MONOREACTIV. MES buffer de 50mmol/L pH 6.0, acetat de calciu 5 mmol/L, clorura de sodium 300 mmol/L, tiocianat de sodium 450 mmol/L, CNP-G3 2.25 mmol/L.

CONSERVARE SI STABILITATE

Se pastreaza la temperaturi cuprinse intre 2-8°C

Monoreactivul este stabil pana la data de expirare scrisa pe eticheta. A se evita contaminarea si reciclarea recipientelor imediat dupa folosinta. (vezi notele).

REACTIVUL SI PROBA DE LUCRU

Monoreactivul este gata preparat pentru a fii utilizat

Proba : Ser, plasma heparinizata si urina.

Serul si plasma de amilaza α este stabila pe o perioada de 30 de zile la temperatura de 2-8°C.

Testele de urina ar trebui sa fie limpezi si fara precipitat pentru testare. Se verifica pH-ul.Urina cu un pH < 5 Ar putea sa reduca stabilitatea enzimara.

Este stabil timp de 10 zile la o temperatura de 2-8°C.

INTERFERENTE

- Anticoagulantii normali, ca acidul citric, acidului oxalic sau EDTA inhiba enzima
- Bilirubina (< 20 mg/dL) si lipidele (trigliceride > 10 g/L0 nu intervin
- Alte substante sau medicamente pot sa intervina

MATERIALE NECESARE

- Fotometru sau spectometru cu celula de citire termostata la 37°C, capabil sa citeasca la 405 nm.
- Ceas de laborator si printer
- Cuvete drumul optic de 1 cm
- Pipete pentru masurarea reactivului si a probelor

PROCEDURA ANALITICA

Metoda calitativa

1. Preincubati reactivul de lucru, probele si controalele la temperatura reactiei
2. Setati fotometrul la absorbanta 0 cu apa distilata.
3. Pipetati intr-o cuveta.

Temperatura de reactie	37°C	
Monoreactiv	1.0 mL	1.0mL
Ser/Plasma	20 μ L	--
Urina	--	10 μ L

4. Mixati usor. Insetati cuveta in orificiu si dati drumul la ceasul de laborator. Incubati pentru 1 minut si notati citirea initiala a absorbantei.
5. Repetati citirea absorbantei exact dupa 1, 2 sau 3 minute
6. Calculati diferentele dintre absorbante.
7. Calculati diferenta dintre rezultate pentru a obtine rapiditatea de absorbantei pe minut

CALCULE

Ser,plasma

$$U/L = \Delta A / \text{min} \times 3591$$

Urina

$$U/L = \Delta A / \text{min} \times 7113$$

Probele cu un $\Delta A / \text{min}$ mai mare de 0.500 la 405 nm ar trebui diluate pana la 1:10 cu solutie salina si calculate din nou. Inmultiti rezultatul cu 10.

In cazul in care rezultatele trebuie exprimate in unitati SI se aplica formula:

$$U/L \times 0.01667 = \mu\text{kat/L}$$

VALORI DE REFERINTA

Ser, plasma

< 86 U/L (1.43 μ kat/L)

Urina

< 470 U/L (7.83 μ kat/L)

Se recomanda ca fiecare laborator sa-si stabileasca propriile valori de referinta.

CONTROL CALITATIV

Pentru a asigura calitatea controlului (QC), fiecare analiza ar trebui sa includa un set de controale (normal si patologic) cu valorile pe care le avem testate ca si cand ar fii necunoscute.

REF

1980005 MULTISER UMAN NORMAL
NIVEL SCAZUT DE α – AMILAZA.
ANALIZA.

REF

1985005 MULTISER UMAN ABNORMAL
NIVEL RIDICAT DE α – AMILAZA.
ANALIZA.

SEMNIFICATIE MEDICALA

Testele de activitate ale amilazei din urina sau ser sunt folosite in special in diagnosticarea bolilor de pancreas si in investigarea functiilor pancreatice.

Amilaza se gaseste in special in saliva si in tesuturile pancreatice. In mod normal , cantitati mici de amilaza se gasesc si in sange, dar mari cantitati de amilaza sunt secretate de pancreas in sange in cazul formelor variate de disfunctii ale acestuia.

Activitatea amilazei in ser poate sa fluctueze rapid crescand ingrijorator In timpul unui atac si scazand aproape de nivelul normal la scurt timp.

Nivele mari apar in cazul pancreatitei acute, obstructie a ductului pancreatic, oreion si infectiei glandelor parotide.

O cantitate semnificativa a serului de amilaza este secretat in urina, si O crestere a activitatii serului este reflectata in cresterea activitatii amilazei. In urina. Amilaza pare sa fie mult mai crescuta in urina, atinge nivele mari, si persista o perioada indelungata.

PERFORMANTE ANALIZEI

- **Linearitate:** Pana la 1000 U/L
- **Precizie**

U/L	In timpul analizei *			Intre analize **		
Mean	50.3	134.1	306	50.3	129	320
SD	0.78	2.31	2.79	1.16	2.6	3.1
CV%	1.55	1.72	0.65	2.32	2.01	0.96
N	10	10	10	10	10	10

* Replicati: 10 pentru fiecare nivel (in timpul analizei)

** Replicati : 10 pentru fiecare nivel timp de 8 zile. (intre analize)

Instrument: CECIL CE 2001

- **Sensibilitate.** Folosind acest reactiv si metoda o citire de $\Delta A/\text{min}$ la 0.00 citita la 405 nm este echivalent a 5 U/L de activitate a amilazei.

- **Corelare.** Aceasta analiza (y) a fost comparata cu o metoda comerciala similara (x). Rezultatele au fost:

$$N = 30 \quad r = 0.998 \quad y = 0.9241x + 5.237$$

NOTA

Nu pipetati cu gura, folositi manusi si evitati contactul cu pielea. Si pielea si gura pot contine amilaza.

REFERINTE

1. Winn-Denn , E.S. David, H. sigler, G. and Chavez, R. Clin. Chem. 34 : 2005 (1988)
2. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Clin. Chem. Lab. Med. 36 : 185 (1998)
3. young, D.S. effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 4th Edition. AACC Press (1995)
4. Tietz. Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Edition. Burtis CA, Ashwood ED. WB Saunders co., 1994