АЛЬФА-АМИЛАЗА (α-amylase-LQ) (кинетический метод с $CNPG_3$/жидкий) 41201, 41202

Кинетический метод определения активности альфа-амилазы в сыворотке, плазме и моче с использованием хлор-нитрофенол- α-D-мальтотриозида ($CNPG_3$).

IVD (для диагностики in vitro) Хранить при 2–8°C.

Код: 41201	20x2 мл	Код: 41202	2x60 мл

ПРИНЦИП МЕТОДА

Прямой метод определения α-амилазы использует хромогенный субстрат – 2-хлор-4-нитрофенол, связанный с мальтотриозой.

$$10\ CNPG_3 \xrightarrow{\alpha\text{-амилаза}} 9\ CNP + CNPG_2 + G_3 + G$$

Как показано выше α-амилаза гидролизует 2-хлор-4-нитрофенил-б-D-мальтотриозид ($CNPG_3$) с высвобождением 2-хлор-4-нитрофенола (CNP) и формированием 2-хлор-4-нитрофенол-б-D-мальтозида ($CNPG_2$), мальтотриозы (G_3) и глюкозы (G).

Скорость формирования CNP может быть определена спектрофотометрически при 405 нм, изменение оптической плотности прямо пропорционально активности альфа-амилазы в пробе. Реакция не прямо зависит от эндогенных ингибирующих факторов.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

α-амилаза – это фермент, который помогает переварить гликоген и крахмал. Он производится в основном экзокринными поджелудочной и слюнными железами.

На протяжении многих лет определение уровня альфа-амилазы в сыворотке и плазме использовалось для диагностики у пациентов острого панкреатита. Ранние методы были основаны на титровании йода и изменении оптической плотности в наибольшем разведении комплекса между йодом и крахмалом, расщепляемым альфа-амилазой. Некоторые методы были основаны на продукции НАДФ пропорционально активности альфа-амилазы.

Большинство настоящих методов основано на продукции р-нитрофенола из насыщенного олигосахаридного субстрата с блокирующими группами, присоединенными к концам молекулы сахара. Позже в этих методах использовались различные расщепляющие ферменты для гидролиза образующихся коротких цепей олигосахаридов с образованием р-нитрофенола. Расщепляющие ферменты содержат остаточную активность альфа-амилазы, что может существенно уменьшать стабильность реагента. Клинический диагноз не может быть поставлен по результату одного теста, он должен определяться по совокупности клинических и других лабораторных данных.

РЕАГЕНТ

Реагент	MES буфер pH 6,0	100 ммоль/л
	2-хлор-4-нитрофенил- α-D-мальтотриозид ($CNPG_3$)	2,25 ммоль/л
	хлорид натрия	350 ммоль/л
	ацетат кальция	6 ммоль/л
	тиоцианат калия	900 ммоль/л
	азид натрия	0,95 г/л

ПОДГОТОВКА

Реагент готов к использованию.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагент готов к использованию. Неоткрытый реагент стабилен до указанной даты, указанной на упаковке при температуре 2-8°C. После открытия реагент стабилен в течение 60 дней при температуре 2-8°C.

Признаки порчи реагентов:

- присутствие частиц или мутности.
- Абсорбция бланка (A) при 405 нм ≥ 0,500.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ

- Анализатор с фильтром 405 нм (400-420нм) и термостатом 37°C.
- Соответствующие кюветы с длиной оптического пути 1 см.
- Стандартное лабораторное оборудование.

ПРОБЫ

Сыворотка, гепаринизированная плазма или моча. Другие антикоагулянты, такие как ЭДТА или цитрат не должны быть использованы. Центрифугирование и отделение сыворотки должно производиться как можно раньше.

Амилаза в сыворотке и моче стабильна в течение 1 недели при комнатной температуре (20-25°C) и до нескольких месяцев в закрытой посуде при 2-8°C.

ПРОЦЕДУРА

Длина волны : 405 (400-420) нм
Оптический путь : 1 см
Температура : 37°C
Измерение : против воздуха (дистиллированной воды), уменьшение оптической плотности.
Метод : кинетика по фактору (3954), задержка – 30с, реакция – 180 с (60с).

Подогреть рабочий реагент и кюветы до нужной температуры.
Непосредственно перед измерением:

Закапать в кюветы	Полумикрометод	Микрометод	ChemWell
Реагент	1 мл	0,5 мл	200 мкл
Сыворотка	20 мкл	10 мкл	4 мкл
Моча	10 мкл	5 мкл	2 мкл

Перемешать, измерить оптическую плотность через 30с инкубации при 405 нм. Затем измерить оптическую плотность ровно через каждую 1 мин в течение 3 минут.
Рассчитать среднее изменение оптической плотности за минуту (ΔA/мин).

ВЫЧИСЛЕНИЕ

Для расчета активности α-амилазы (Е/л) полученную ΔA/мин умножают на следующие коэффициенты:

Сыворотка, плазма	**Е/л = ΔA/мин x 3954**
Моча	**Е/л = ΔA/мин x 7908**

Фактор для перевода международных единиц (Е/л или U/L) в единицы СИ (кат/л):
1 Е/л = 16.67 нкат/л 1 мккат/л = 60 Е/л.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контроли с каждой серией проб. Для контроля могут быть использованы нормальные и патологические контрольные сыворотки SPINTROL (Кат.№ 1002120 и 1002210). Если значения контролей вне определенного диапазона, проверьте прибор, реагенты и калибратор на отсутствие проблем. Каждая лаборатория должна разработать свою собственную систему контроля качества и корректирующие действия, если контроли не дают приемлемые результаты.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ[1]

	37°C
Сыворотка, плазма:	< 90 Е/л
Моча:	< 450 Е/л

Настоятельно рекомендуется в каждой лаборатории устанавливать свой диапазон нормы.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

***Диапазон измерения*:** от определяемого уровня в 1 Е/л до предела линейности 2000 Е/л. Если полученные результаты превышают предел линейности, пробы следует разбавить 1:2 физраствором (9 г/л NaCl) и повторить исследование, полученный результат умножить на 2.

***Воспроизводимость*:**

	Внутри серии (n=20)		Между сериями (n=20)	
Среднее (U/L)	61,2	165	65,1	172
SD	1,00	2,44	2,84	4,57
CV (%)	1,64	1,47	4,36	2,65

Чувствительность: 1 Е/л = 0.00003 ΔA/мин.

Правильность: Результаты, полученные с помощью реагентов SPINREACT (y) не показали систематических различий при сравнении с другими коммерческими реагентами (x). Результаты оценки характеристик теста зависят от используемого анализатора.

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ

Гемолиз влияет на результаты[1]. Ферментативная активность α-амилазы зависит от температуры. Тесты, выполняемые при температурах <37ºC или >37ºC, будут показывать заниженные или завышенные результаты относительно реального уровня. Список лекарств и других веществ, влияющих на определение α-амилазы, представлен Young et.al[3,4].

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Ферментативная активность α-амилазы зависит от температуры. Тесты, выполняемые при температурах <37ºC или >37ºC, будут показывать заниженные или завышенные результаты относительно реального уровня.
2. Пот и слюна содержат альфа-амилазу. Для предупреждения загрязнения проб не всасывайте жидкости в пипетки ртом и избегайте контакта пробы, реагента и наконечника пипетки с кожей.
3. Реактив содержит тиоцианат калия. Избегайте ингаляции или контакта реактива с кожей или глазами, промойте кожу или глаза водой и проконсультируйтесь с врачом, если такой контакт произошел.
4. **Процедуры для различных автоматических анализаторов доступны по запросу**.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ying Foo A et al. Amylase measurement with 2-chloro-4nitrophenyl maltrotrioside as substrate. Clin Chim 272, 1998; 137-147.
2. McNeely M. Amylase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1112-116.
3. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
4. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
5. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
6. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.