α-AMY

Набор для определения активности α-амилазы (метод в соответствии с рекомендациями IFCC)

Информация для заказа

Номер по каталогу	Фасовка
AMY0102	R1 1×38 мл + R2 1×10 мл
AMY0103	R1 4×20 мл + R2 2×10 мл
AMY0105	R1 2×250 мл + R2 1×125 мл

Назначение

Реагент α-AMY предназначен для количественного определения активности α-амилазы (1, 4-α-D-глюканогидролазы) в сыворотке, плазме или моче кинетическим методом на фотометрических системах.

Сводка[1, 2]

α-амилазы образуются в различных органах, преимущественно в поджелудочной (панкреатическая, П-тип) и слюнных железах (слюнная, С-тип). α-амилазы катализируют гидролитическое расщепление полимерных углеводов, таких как амилоза, амилопектин и гликоген, на более мелкие фрагменты за счет разрыва 1,4-α-гликозидных связей. П-амилаза синтезируется в поджелудочной железе и выделяется в кишечник; С-амилаза синтезируется в слюнных железах и выделяется со слюной. Из-за малой молекулярной массы амилаза крови выводится почками и выделяется с мочой. Повышение активности амилазы в моче отражает увеличение уровня активности амилазы в сыворотке. Измерение α-амилазы в сыворотке и моче используется преимущественно для диагностики заболеваний поджелудочной железы, а также для определения развития осложнений. В норме α-амилазы демонстрируют низкую активность, при остром панкреатите активность амилаз в крови возрастает в течение 8-12 часов после появления боли в животе, достигая макисимума приблизительно через 12-24 часа. Активность амилазы в крови возвращается к нормальным значениям через 2-5 дней, но высокий уровень амилаз в моче сохраняется в течение 5-7 дней.

Тем не менее, некоторые непанкреатические заболевания, например, паротит, почечная недостаточность или воспаление лёгких, также могут вызывать повышение уровня амилазы. Для подтверждения панкреатических заболеваний рекомендуется одновременно определять уровень еще одного из ферментов поджелудочной железы, например, липазы или панкреатической-α-амилазы.

Метод[3,4,5]

Метод в соответствии с рекомендациями IFCC (Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины).

Принцип реакции

$$5\text{Этилиден-}G_7\text{-PNP} + 5H_2O \xrightleftharpoons{\alpha\text{-амилаза}} 2\text{Этилиден-}G_5 + 2G_2\text{-PNP} + 2\text{Этилиден-}G_4 + 2G_3\text{-PNP} + \text{Этилиден-}G_3 + G_4\text{-PNP}$$

$$2G_2\text{-PNP} + 2G_3\text{-PNP} + G_4\text{-PNP} + 14H_2O \xrightleftharpoons{\alpha\text{-глюкозидаза}} 5\text{PNP} + 14\text{Глюкоза}$$

(PNP—п-нитрофенол; G—α-глюкоза)

При анализе субстрат 4,6-этилиден-(G7)-1,4-нитрофенил-(G1)–α, D-мальтогептозид (EPS-G7) расщепляется α-амилазами с последующим гидролизом продуктов расщепления до п-нитрофенола с помощью α-глюкозидазы (100% выход хромофора). Увеличение поглощения п-нитрофенола при 405 нм прямо пропорционально активности α-амилаз.

Реагенты

Компоненты и концентрации

R1:	Трис-буфер	50 ммоль/л
	Сульфат магния	10 ммоль/л
	α-глюкозидаза	4500 Ед/л
R2:	Трис-буфер	50 ммоль/л
	E-pNP-G_7	5,5 ммоль/л

Предупреждения и меры предосторожности

1. Для диагностики *in vitro.*
2. Не касайтесь пипеток ртом и избегайте контакта реагента с кожей. (Слюна и пот содержат α-амилазу!).
3. Содержит азид натрия. Не глотать. Избегайте попадания реагента на кожу и слизистые оболочки.
4. При использовании лабораторных реактивов соблюдайте необходимые меры предосторожности.
5. Утилизируйте все отходы в соответствии с местными правилами утилизации.
6. Паспорт безопасности материала предоставляется пользователям по запросу.

Подготовка реагентов

Реагенты R1 и R2 готовы к использованию.

Хранение и стабильность

Стабилен до истечения срока годности, указанного на этикетке, если хранится закрытым при 2°C—8°C в защищенном от света месте.

После вскрытия флакона реагент стабилен в течение 30 дней, если хранится в холодильнике или в охлаждаемом отсеке анализатора.

Избегайте загрязнения реагентов.

Не замораживайте реагенты.

Оптическая плотность реагента

Оптическая плотность реагента при 405 нм должна быть ≤0,6 А.

Реагент бланк

Для определения реагент бланка (холостой пробы по реагенту), пробу заменяют физиологическим раствором (9 г/л NaCl) или водой. Если скорость изменения оптической плотности реагента (ΔA/с) превышает 0,0005, необходимо повторить измерения и при необходимости заменить раствор реагента.

Необходимые материалы, не входящие в набор

1. Калибраторы и контроли, указанные ниже.
2. Раствор NaCl, 9 г/л.
3. Общее лабораторное оборудование.

Сбор и подготовка проб

1. В качестве пробы можно использовать сыворотку, мочу, гепаринизированную плазму или плазму с ЭДТА. Не рекомендуется использовать гемолизат или цельную кровь. Лучше всего использовать свежеприготовленную сыворотку, плазму или мочу.
2. Используйте подходящие пробирки или ёмкости для сбора проб, соблюдайте инструкции производителя, материал пробирок или ёмкостей не должен реагировать с образцом.
3. Если образцы мочи содержат осадок, отцентрифугируйте их перед началом анализа.
4. Стабильность образцов:

Сыворотка/плазма: 7 дней при 20–25°C	Моча: 2 дня при 20–25°C
1 месяц при 2–8°C	10 дней при 2–8°C
1 год при -20°C	3 недели при -20°C

Процедура анализа

	Бланк	проба
Реагент 1	200 мкл	200 мкл
Дист. вода	5 мкл	—
проба	—	5 мкл
Перемешать, инкубировать 5 мин, затем добавить:		
Реагент 2	50 мкл	50 мкл
Тщательно перемешать, через 1 минуту измерить поглощение и засечь время. Измерить поглощение еще через 2 минуты.		
ΔA/мин = [ΔA/мин пробы] - [ΔA/мин холост.]		

В данном документе, также, приведены инструкции для анализаторов серии BS. Инструкции по использованию на анализаторах других моделей см. в соответствующих руководствах по эксплуатации.

Калибровка

1. Рекомендуется использовать мультикалибратор Human производства компании Randox. Сведения о прослеживаемости калибратора содержатся в инструкции по использованию калибратора, предоставляемой компанией Randox.
2. Частота калибровки: При смене лота реагента.

   В случае значительного расхождения результатов контроля качества.

Контроль качества

В каждой серии исследований необходимо проанализировать как минимум два уровня контрольного материала. Эти пробы должны выполняться при каждой новой калибровке, каждом новом флаконе реагентов и после некоторых процедур технического обслуживания, как указано в руководстве по эксплуатации системы.

Для контроля качества рекомендуется использовать материалы на основе человеческой сыворотки Assayed Control уровней II и III компании Randox.

В каждой лаборатории должна быть установлена своя схема внутреннего контроля качества и меры, которые следует предпринимать при выходе результатов контролей за допустимые пределы.

Вычисления

Анализатор автоматически вычисляет активность каждого образца с учетом калибровочного коэффициента (фактора), полученного при проведении калибровки.

Коэффициент перевода традиционных единиц (Ед/л) в единицы СИ (мккат/л):

1 Ед/л = $16,67\times10^{-3}$ мккат/л, 1 мккат/л= 60 Ед/л

Референсные интервалы

В каждой лаборатории должны быть установлены свои референсные интервалы, характерные для данной местности и контингента пациентов. Приведенные ниже референсные интервалы, соответствующие исследованиям при 37 °C, взяты из литературных источников[6].

Проба	Традиционные единицы	Единицы СИ
Сыворотка (Мужчины / Женщины)	≤220 Ед/л	≤3,67 мккат/л
Разовая моча	≤1000 Ед/л	≤16,67 мккат/л
Суточная моча	≤900 Ед/24 ч	≤15,00 мккат/24 ч

Рабочие характеристики

Ниже приведены типичные рабочие характеристики для систем Mindray. Результаты могут различаться в зависимости от прибора, лаборатории или при использовании ручной процедуры исследования.

Влияющие вещества / Специфичность

Следующие вещества были проверены на влияние на результаты анализа. Критерий: Получение результата в пределах ± 10 % от исходного значения.

Вещество	Уровень	Наблюдаемый эффект
Аскорбиновая кислота	30 мг/дл	НВ*
Билирубин	40 мг/дл	НВ
Гемоглобин	500 мг/дл	НВ
Липемия	500 мг/дл	НВ
* НВ: Не влияет (в пределах ± 10 %)		

Аналитический диапазон

Система Mindray (анализатор серии BS / реагент Mindray AMY) обеспечивает исследования в следующих пределах:

Образец	Традиционные единицы	Единицы СИ
Сыворотка / Плазма / Моча	5—1500 Ед/л	0,08—25 мккат/л

Если активность превышает 1500 Ед/л, пробу следует развести физиологическим раствором 9 г/л NaCl (например 1+9) и повторить анализ с этим разведением, полученный результат следует умножить на 10.

Чувствительность / Предел обнаружения

Минимальная измеряемая активность α-AMY составляет 5 Ед/л (0,08 мккат/л) с надежностью 99,7%.

Воспроизводимость

Воспроизводимость, полученная на контрольной сыворотке в соответствии с рекомендациями руководства NCCLS EP5-A[7] приведена в таблице. Ед.: Ед/л

Воспроизводимость	Контроль II			Контроль III		
	Среднее	SD	CV%	Среднее	SD	CV%
Внутрисерийная	78.31	0.96	1.2	258.79	1.71	0.7
Между сериями		0.55	0.7		1.07	0.4
Между днями		1.10	1.4		4.54	1.8
Общая		1.56	2.0		4.96	1.9

Сопоставление методов

Сравнение системы Mindray (анализатор серии BS/реагент Mindray α-AMY и Hitachi/Roche (Hitachi/Roche α-AMY, IFCC) (x) на 44 пробах показало следующую корреляцию (Ед/л):

Y=1,027x+5,245, r=0,999.

Более подробная информация об исследованиях корреляции предоставляется по запросу.

Используемая литература

1. Agarwal N, Pitchumoni CS, Sivaprasad AV. Evaluating tests for acute pancreatitis. Am J Gastroenterol. 1990 Apr; 85(4):356-66.
2. Moss DW, Henderson AR. Digestive enzymes of pancreatic origin. B: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999:689-698.
3. Kruse-Jarres JD, Kaiser C, Hafkenscheid 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(2):103-113.
4. Schumann G, Aoki R, Carlo A et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 8. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of α-amylase. Clin Chem Lab Med 2006; 44(9):1146–1155.
5. Lorentz, K. Routine alpha-amylase assay using protected 4-nitrophenyl-1, 4-alpha-D-maltoheptaoside and a novel alpha-glucosidase. Clin Chem 2000; 46(5): 644 - 649.
6. Hohenwallner W, Stein W, Hafkenscheid JC, Kruse-Jarres JD, Kaiser C, Hubbuch A et al. Reference ranges for alpha-amylase in serum and urine with 4,6-ethylidene-(G7)- 1-4-nitrophenyl-(G1)-alpha,D-maltoheptaoside as substrate. J Clin Chem Clin Biochem 1989; 27(2): 97-101.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline, NCCLS publication EP5-A 1999, Vol.19, No.2.

Параметры анализаторов серии BS

Экран параметров		BS-120	BS-200	BS-300	BS-380	BS-400
Тип реакции		Кинетический метод				
Направление		Увеличения				
Единицы		Ед/л				
Точный/Десятичный		0.1	0.1	1	0.1	0.1
Перв. длина волны		405			412	
Втор. длина волны		510			505	
Объем пробы (мкл)		5				
R1 (мкл)		200				
R2 (мкл)		50				
Время реакции	От	3	4	5	41	50
	До	10	12	15	51	64
Время инкубации		/	19	25	/	/
Время холост. пробы		/				
Область линейности	От	5				
	До	1500				
Предел субстрата		/				
Коэффициент						
Экран «Калибровка»						
Правило		Линейная по 2 точкам				
Повторы		3-5				

© 2010 Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd. All rights Reserved

SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD.
Mindray Building, Keji 12th Road South, Hi-tech Industrial Park, Nanshan, Shenzhen, 518057 P.R. China
EC REP Shanghai International Holding Corp. GmbH(Europe)
Eiffestraβe 80, 20537 Hamburg Germany