

Referenční postup měření katalytické koncentrace α -amylázy při 37 °C. Metoda IFCC.

J. Kratochvíla, B. Friedecký
SEKK Pardubice

Referenční postup měření katalytické koncentrace α -AMS v krevním séru vypracovala komise IFCC pro enzymové referenční systémy (IFCC Committee on Reference Systems for Enzymes (C-RSE)) pod vedením prof. G.Schumanna z Hannoveru jako osmou část doporučení IFCC pro stanovení enzymů. Postup bude publikován v časopise Clinical Chemistry and Laboratory Medicine pod názvem:

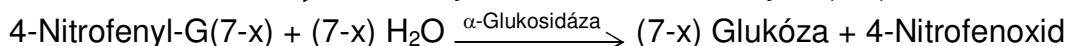
IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37 °C

Part 8. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of α -Amylase [α -Amylase: 1,4- α -D-Glucan 4-Glucanohydrolase (AMY), EC 3.2.1.1]

Postup byl dokončen a k připomínkám odeslán v lednu 2005. Referenční postup je odvozen z již dříve publikované referenční metody IFCC (1). Použití teploty 37 °C namísto původních 30 °C vedlo jen k minimálním změnám v optimalizaci podmínek stanovení. Zatímní recenze navrženého postupu jsou velmi kladné a připomínky jsou minimální, takže data konečné publikované verze se zjevně nebudou lišit od dat námi uvedených v tomto sdělení.

Části 1 - 7 Referenčních postupů IFCC pojednávají o referenčních měřicích systémech pro ostatní enzymy, jmenovitě pro AST, ALT, CK, γ GT, LD a o enzymových certifikovaných referenčních materiálech IFCC-IRMM a jsou ve stručné formě k nalezení na <http://www.sekk.cz> v oddíle Infoservis.

Princip měření



Reakce je monitorována fotometrickým měřením přírůstku absorbance žlutého 4-nitrofenoxidu při vlnové délce 405 nm. Jako pufr je použit HEPES. CaCl_2 a NaCl jsou použity jako modifikátory enzymové reakce.

Zkratky:

EPS: 4,6-Ethyliden(G1)-4-nitrofenyl(G7)- α -(1->4)-D-maltoheptaosid (substrát)

HEPES: N-2- hydroxyethylpiperazin-N'-ethan sulfonová kyselina

Podmínky měření

Tabulka 1: Složení finální reakční směsi

N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethan-sulfonová kyselina	50 mmol.l ⁻¹
pH (37 °C)	7 ± 0,03
4,6-Ethyliden(G1)-4-nitrofenyl(G7)- α -(1->4)-D-maltoheptaosid	5 mmol.l ⁻¹
Chlorid sodný	70 mmol.l ⁻¹
Chlorid vápenatý	1 mmol.l ⁻¹

α -Glukosidáza (bacillus stearothermophilus -37 °C)	135 $\mu\text{kat.l}^{-1}$ (8100 U/l)
Objemový poměr séra	0,03226 (1 : 31)

Molární absorpční koeficient indikátoru (nitrofenoxidu) silně závisí na pH. Změna ΔpH o 0,01 způsobuje změnu v kinetice asi o 1 %. Proto je nutné plně respektovat přesné nastavení pH tak, jak je uvedeno v tabulce 1 (3).

Tabulka 2: Reakční podmínky měření

Teplota	37 °C \pm 0,1 °C
Vlnová délka	405 nm \pm 1 nm
Pološířka vln. délky	\leq 2 nm
Optická dráha (tloušťka kyvety)	10 mm \pm 0,01 mm
Čas inkubace	60 s
Čas preinkubace	180 s
Interval měření	180 s
Počet bodů měření	\geq 6

Chemikálie

Kyselina N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonová [HEPES] ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$),
 $M_r = 238,31$

4,6-Ethyliden(G1)-4-nitrofenyl(G7)- α -(1 \rightarrow 4)-D-maltoheptaosid [EPS], ($\text{C}_{50}\text{H}_{77}\text{NO}_{38}$),
 $M_r = 1300,2$

α -Glukosidáza (EC 3.2.1.20) z mikroorganismu (např. z bacillus stearothermophilus)

Chlorid sodný (NaCl), $M_r = 58,44$

Chlorid vápenatý, dihydrát ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), $M_r = 147,02$

Hovězí sérový albumin, Frakce V, $M_r = 68\ 000$

Požadavky na kvalitu chemikálií

EPS

Kontaminace substrátu EPS 4-nitrofenyl- α -D-maltoheptaosidem (G7-4-NP) může způsobit prodloužení preinkubační fáze (lag fáze) a může pak i interferovat s měřením. Hmotnostní podíl G7-4-NP v EPS nesmí překročit hodnotu 0,001.

α -Glukosidáza

Lze použít jen takového přípravku, který umožní štěpení všech glykosidových vazeb α -amylázového reakčního produktu například z bacillus stearothermophilus (3).

Hovězí sérový albumin

Nesmí obsahovat proteázy. Tato vlastnost musí být deklarována ve specifikaci výrobce IVD.

Příprava roztoků

Je třeba použít vysoce čistou vodu v kvalitě bidestilované vody (vodivost $< 2 \mu\text{S/cm}$, silikáty $< 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$). Rozšířená kombinovaná nejistota ($k = 2$) (gaussovská distribuce) postupu vážení musí být $U_c \leq 1,5 \%$ (3).

Roztok 1

Vodný roztok 313,1 mmol.l^{-1} CaCl_2 dihydrátu

Roztok 2

Vodný roztok 52,10 mmol.l⁻¹ N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonové kyseliny a 86,13 mmol.l⁻¹ chloridu sodného

Diluent pro reakční enzymy

Vodný roztok 1,20 g.l⁻¹ hovězího albuminu a 154 mmol.l⁻¹ NaCl.

Roztok 3

16,9 mkat.l⁻¹ (1,014 kU/l) α -glukosidázy při 37 °C rozpuštěné v diluentu pro reakční enzymy

Reagencie

Reakční roztok

Promíchá se 25 ml roztoku 2 s 0,25 ml roztoku 3.

Stabilita při 2 °C až 8 °C je 2 týdny.

Startovací roztok

Vodný roztok 31,00 mmol.l⁻¹ 4,6-Ethyliden(G1)-4-nitrofenyl(G7)- α -(1->4)-D-maltoheptaosidu a 52,1 mmol.l⁻¹ HEPES adjustovaný pomocí 0,2 mol.l⁻¹ NaOH na pH (37 °C) 7,00.

Postup měření

Vytemperuje se odpovídající objem vzorku (~ 0,6 ml pro jedno měření) startovacího roztoku na 37 °C krátce před měřením. Zbytek startovacího roztoku se uchovává při teplotách 2 °C až 8 °C.

Do kyvety se pipetují následující objemy reagensů po sobě (tabulka 3).

Tabulka 3: Postup měření

2,000 ml	Reakční roztok <i>Vytemperovat na teplotu 37,0 °C</i>
0,080 ml	Vzorek <i>Intenzivně se promíchá a inkubuje po dobu 60 s. Po skončení inkubace by měl mít roztok v kyvetě teplotu 37 °C</i>
0,400 ml	Startovací roztok <i>Intenzivně se promíchá, čeká se po dobu 180 s a pak se měří přírůstek absorbance v závislosti na čase po dobu 180 s.</i>

Je třeba užít kvalitní spektrofotometr s vysokým stupněm rozlišení a metrologicky ověřené pipety a odměrné nádoby. Musí být vyhodnoceny a dokumentovány standardní nejistoty kinetického fotometrického měření a měření objemu vzorku.

Reagenční blank

K určení hodnoty reagenčního blanku se nahradí měřený vzorek roztokem 9 g.l⁻¹ (154 mmol.l⁻¹) chloridu sodného. Postup měření je stejný jako je uvedeno výše v tabulce 3. Počáteční absorbance nesmí překročit 0,35 a časová změna absorbance blanku pak musí být menší než $3,3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (0,002 min⁻¹). Musí být odstraněny všechny možné zdroje kontaminace (zejména slinná α -AMS) a nečistoty reagensů.

Blank vzorku

K určení hodnoty blanku vzorku se nahradí startovací roztok roztokem 9 g.l^{-1} (154 mmol.l^{-1}) chloridu sodného. Postup měření je stejný jako je uvedeno výše v tabulce 3. *Blank vzorku se stanoví a dokumentuje, ale nebere v potaz při výpočtu katalytické koncentrace. Hodnota blanku vzorku u referenčních materiálů (kalibrátorů a/nebo kontrolních materiálů) nesmí překročit 1 % celkové katalytické koncentrace ve vzorku.*

Horní mez pracovního rozsahu metody

Jestliže změna absorbance v měřicím intervalu překročí $0,0039 \text{ s}^{-1}$ ($0,234 \text{ min}^{-1}$), vzorku musí být naředěn vodným roztokem 9 g.l^{-1} (154 mmol.l^{-1}) chloridu sodného a měřicí postup se opakuje s takto naředěným vzorkem. Nalezená výsledná hodnota musí být po měření přepočtena násobením ředícím faktorem.

Zdroje chyb

Katalytická koncentrace α -glukosidázy ve finální reakční směsi je různě inhibována specifickými matricemi měřených vzorků (3). Tyto inhibice musí výrobci IVD zvážit a studovat pro všechny typy matric měřených vzorků (sérum, plazma, pracovní kalibrátor, kontrolní materiály).

Kontaminace slinnou α -AMS vede k prudkému zvýšení naměřené hodnoty nebo k neakceptovatelnému vzestupu hodnoty reagenčního blanku.

Výpočet

Časová změna absorbance (s^{-1}) je vypočtena regresní analýzou (metodou nejmenších čtverců). Po odečtení hodnoty reagenčního blanku (s^{-1}) se vynásobí takto korigovaná změna absorbance (s^{-1}) faktorem

$$F = 3063 \quad (\text{měření při } 405 \text{ nm}, \epsilon_{405}(4\text{-NP}) = 1012 \text{ m}^2.\text{mol}^{-1})$$

$\Delta A/\Delta t_{\text{Amylasa}}$ Změna absorbance (s^{-1}) po korekci na reagenční blank (s^{-1})

b_{Amylasa} **Katalytická koncentrace α -amylázy ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)**

$$b_{\text{Amylasa}} = 3063 \Delta A/\Delta t_{\text{Amylasa}} (\mu\text{kat.l}^{-1})$$

Poznámka: Ohledně vlivu pH na ϵ_{405} (molární absorpční koeficient) je třeba poznamenat, že závislost ϵ_{405} na přítomnosti bílkovin je řešena uzancí a použitý $\epsilon_{405}(4\text{-NP}) = 1012 \text{ m}^2.\text{mol}^{-1}$ je doporučen dle IRMM/IFCC.

Referenční interval

Předběžný referenční interval v krevním séru byl stanoven ve dvou referenčních laboratořích měřeními dvou referenčních populací (celkem 146 mužů a žen). Nebyl nalezen signifikantní rozdíl (t-test, $p < 0,05$) mezi oběma referenčními kolektivy tvořenými muži a ženami.

Referenční interval byl určen jako 2,5 až 97,5 percentil, přičemž u obou z nich byly počítány hodnoty 90% intervalu spolehlivosti.

Předběžný referenční interval pro muže a ženy (≥ 17 let) je:

Dolní referenční mez - 2,5 percentil (90 % interval spolehlivosti):
 $0,52 \mu\text{kat.l}^{-1}$ ($0,42 \mu\text{kat.l}^{-1}$ až $0,60 \mu\text{kat.l}^{-1}$)

Horní referenční mez - 97,5 percentil (90 % interval spolehlivosti):
 $1,78 \mu\text{kat.l}^{-1}$ ($1,71 \mu\text{kat.l}^{-1}$ až $2,00 \mu\text{kat.l}^{-1}$)

Tento referenční interval byl již verifikován dalšími pracovišti.

Referenční interval získaný ve studii NORIP 2000 (4)

Hodnoty jsou opět společné pro dospělé muže a ženy a jsou téměř perfektně shodné s výše uvedenými, získanými referenčním IFCC postupem, ačkoliv byly získány rutinními kity IVD pouze s použitím „IFCC kalibrace“.

Krevní sérum: 0,45 až 2,0 $\mu\text{kat.l}^{-1}$

Plazma: 0,4 až 2,0 $\mu\text{ka.l}^{-1}$

Shrnutí a praktické dopady nového referenčního postupu IFCC měření α -amylázy

V současné době je k dispozici certifikovaný referenční materiál CRM IFCC/IRMM 456 α -amylase (IRMM je referenční instituce Evropského společenství - Institute for Reference Materials and Measurements se sídlem v Geelu - Belgie). Tento materiál je uveden v databázi Spojené komise pro návaznost v laboratorní medicíně - JCTLM a lze ho vyhledat na některé z webových adres:

<http://www.bipm.org>

<http://www.ifcc.org>

<http://www.cskb.cz>

<http://www.cmi.cz>

Jeho certifikace je popsána už od roku 1999 (5) - viz i webovou adresu <http://www.sekk.cz> – Infoservis a práce Pavla Sedláka. Praktickým dopadem jeho existence je „kalibrace IFCC“, která je už několik let všeobecně používána výrobci IVD, organizátory EHK a zejména v praxi klinických laboratoří, kde umožňuje dosahovat dobře porovnatelných výsledků mezi různými laboratořemi. Kalibrace IFCC je dobře známa a velkou většinou našich laboratoří a výrobců IVD používána. Pokud však doposud neexistoval oficiální referenční postup měření, nebyla k dispozici ani dostatečně exaktní báze pro certifikaci referenčních materiálů a realizaci co nejvyššího stupně návaznosti výsledků rutinních měření.

Vytvoření a publikace referenčního postupu IFCC vytváří pro certifikaci referenčního materiálu exaktní bázi, povede k vyššímu stupni návaznosti, lepší srovnatelnosti a jednotné klinické interpretaci výsledků.

Literatura

1. Lorentz K, International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Approved Recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 9. IFCC Method for α -Amylase (1,4- α -D-Glucan 4-Glucanohydrolase, EC 3.2.1.1). Clin Chem Lab Med 1998; 36: 185-203.
2. Linsinger T, Schimmel H, Pauwels J, Schumann G, Siekmann L, IRMM/IFCC information, Catalytic concentration of α -amylase determined by IFCC reference method at 37 °C, IRMM/IFCC-460 2001; EUR 19927 EN
3. Schumann G. et al.: Appendix in text: Part 8. Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of α -Amylase [α -Amylase: 1,4- α -D-Glucan 4-Glucanohydrolase (AMY), EC 3.2.1.1]. SD-C-RSE of IFCC. Draft January 2005.
4. Rustad P, Felding L, Franzson L a spol. The Nordic reference interval project 2000: recommended reference intervals for 25 common biochemical properties. Scand J

Clin Lab Invest 2004,64,271-284. (Dostupné též na webové adrese:
<http://wip.furst.no/norip/>)

5. IFCC, Scientific Division Committee on Enzymes, Lorentz K.: Approved Recommendation on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes Part 9. IFCC Method for α -Amylase (1,4-alpha-D-Glucan 4-Glucanohydrolase, EC.3.2.1.1), Clin.Chim.Acta, 1999 281 S5 – S39.