

Kalibrace katalytických koncentrací enzymových aktivit rutinních enzymů v klinické biochemii pomocí primárních standardních roztoků na autoanalyzátoch

Stanovení α -amylázy

(1,4- α -D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1.)

Zpracoval:

Ing. Pavel Sedlák
OKB MN Čáslav, Jeníkovská 348, 286 01 Čáslav

Editor:

RNDr. Josef Kratochvíla
SEKK, Za Pasáží 1609, 530 02 Pardubice

Publikováno: 11.7.2002

Revize: Minimalistická, dílčí revize provedena v roce 2019 autorem v oblasti použitých jednotek, aktualizace doplnění platné verze referenční metody IFCC a CRM, aktualizace produktové řady firmy ERBA-Lachema

Obsah

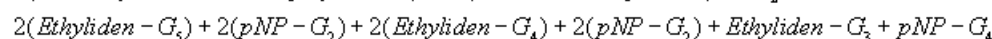
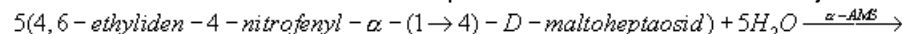
Teoretický úvod
Dostupný referenční materiál
Obecný návod postupu kalibrace
Praktický příklad pro analyzátor HITACHI 911
Seznam zkratk
Literatura

Teoretický úvod

Popis výchozí situace

Pro kalibraci stanovení α -amylázy (α -AMS) za užití substrátu EPS-G7 (37 °C) (1,2) pomocí komerčních diagnostických souprav platí v obecné rovině většina faktů, konstatovaných při řešení problematiky kalibrace stanovení k.k. ALP dle DGKCh 94 (4). V případě stanovení k.k. α -AMS je ale nutno v mnohých bodech kalibrační postup modifikovat a doplnit. Hlavním důvodem je skutečnost, že v případě α -AMS při 37 °C pro metodu s 4,6-Ethyliden(G1)-4-nitrofenyl(G7)-alfa-(1->4)-D-maltoheptaosidem jako substrátem platí:

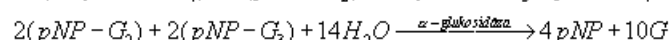
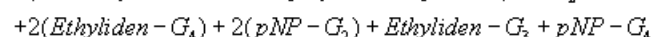
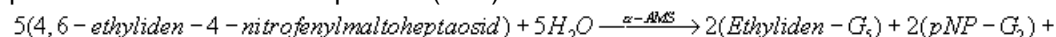
1. volba reakčního $pH \approx 7,15$, determinovaného optimalizací reakčních podmínek co do rychlosti štěpení substrátu a zohlednění obou izoenzymů (slinný a pankreatický), není zdaleka optimální pro přímé sledování nárůstu absorbance konečného reakčního produktu, 4-nitrofenolu (nebo lépe 4-nitrofenoxidu). Ten se za tohoto pH, blízkého disociační konstantě 4-nitrofenolu ve vodném prostředí ($pK = 7,17$), chová jako acidobazický indikátor, jehož molární absorptivita je silně závislá i na nepatrné změně pH reakční směsi. (změna pH ze 7,00 na 7,03 způsobuje již 3% nárůst hodnot k.k. α -AMS). Množství barevné - fenolátové formy 4-nitrofenolu, kterou monitorujeme kineticky, je tedy na rozdíl od stanovení k.k. ALP, kde jsme pracovali v prostředí s $pH = 10,1$, tedy s prakticky úplně disociovanou (barevnou) formou 4-nitrofenolu, silně závislé i na nepatrné změně pH reakční směsi.
2. pK 4-nitrofenolu se nezanedbatelně mění v přítomnosti povrchově aktivních látek např. proteinů, tensidů aj.
3. pK 4-nitrofenolu se nezanedbatelně mění v závislosti na použitém typu a složení pufráčnického prostředí a teplotě
4. látkové množství 4-nitrofenolu produkované reakční sekvencí je závislé na typu použité glukosidázy



Prvotní štěpy glukosylových částí G2, G3 a G4 s navázaným 4-nitrofenolem štěpí kompletně pouze bifunkční (bakteriální) glukosidáza, která je povinnou součástí reakční směsi IFCC normované metody v roce 2005.

Reakce je pak ekvimolární co do poměru substrát reakční produkt, tj. (5 : 5).

Monofunkční (kvasnicová) glukosidáza neumí zpracovat glukosylový štěp G4, což má za následek změnu stechiometrie poměru Substrát : Reakční produkt (5 : 4)



Přesto i to je problém dobře zvládnutelný a vyrovnává se s ním následující modifikovaný kalibrační postup.

Návrh řešení

Výše uvedené skutečnosti je nutné zohlednit v postupu kalibrace za použití kalibračního roztoku reakčního produktu (4-nitrofenolu, nebo lépe 4-nitrofenoxidu) vhodně voleným složením reakční směsi a režimem práce analyzátoru, které nám umožní eliminovat popsané vlivy.

Přijatá opatření:

K bodu 1): Vzhledem k dodržení identického pH při vlastní kalibraci a při rutinním měření nelze aplikovat postup praktikovaný u kalibrace ALP, tj. náhrada substrátu R2 destilovanou vodou.

U některých výrobců je dokonce pH pro R1 a R2 odlišné (výhodné pro stabilitu činidel), výsledné pH je modelováno až dávkováním komponent reakční směsi, takže náhrada R2 destilovanou vodou je nepřijatelná zcela zjevně.

Schůdným a elegantním řešením tohoto problému je metodický postup "**standardního přidavku**" 4-nitrofenolu do kompletní reakční směsi.

Tento modifikovaný postup navíc vyvolává změnu v některých krocích provedení kalibrace:

- V režimu END POINT při vlastní kalibraci nastavujeme měřicí časový bod na takovou hodnotu, která představuje inkubační dobu rovnou době, za kterou použitý analyzátor vyjadřuje změnu absorbance za časovou jednotku v režimu RATE.

$$\frac{\Delta A}{60s}$$

Příklad: Vyjadřuje-li analyzátor v režimu RATE $\frac{\Delta A}{60s}$, tedy za 1 minutu, nastavíme dobu měření rovněž na 1 minutu po přidavku substrátu R2.

- Po získání kalibračního faktoru v režimu END POINT a návratu aplikace do režimu RATE již nenásleduje korekce na samovolný rozpad substrátu. Ten je již zahrnut v získaném kalibračním faktoru, neboť substrát byl přítomen v reakční směsi již při kalibraci, doba expozice je pak zohledněna voleným měřicím bodem v režimu END POINT.

K bodu 2): Řešení umožňuje přijetí závěru, že je nutné k získání exaktní hodnoty molární absorbance 4-nitrofenolu zohlednit minimálně dva případy:

- a. Stanovení v moči: použít standardní roztok 4-nitrofenolu bez obsahu proteinu
- b. Stanovení v séru: použít standardní roztok 4-nitrofenolu s obsahem proteinu (např. minimálně 30 g.L⁻¹ roztok albuminu)

K bodu 3): Tyto parametry zohledňuje provedení kalibrace primárním roztokem reakčního produktu již v obecně platném postupu tohoto typu kalibrace.

K bodu 4): Dle typu použité glukosidázy v daném typu soupravy pro stanovení α -AMS aplikujeme přepočtení koncentrace roztoku 4-nitrofenolu na vyjádření odpovídající katalytické koncentrace α -AMS.

Poznámka:

Stav k datu vzniku textu (rok 2002).

Normované analytické postupy dle IFCC, publikované v letech 1999-2001 pro teplotu 30 °C a následně adaptované pro teplotu 37 °C, se komerčně neujaly. Definitivní přechod metod IFCC na reakční teplotu 37 °C začátkem roku 2002, který je možno v našich zemích jen uvítat, neakceptoval již vypracované normované postupy stanovení α -AMS. Zdánlivě jsme tedy v horší situaci než v loňském roce (v současné době - červenec 2002 - neexistuje mezinárodně normovaná metoda). Prakticky se ale nic nezměnilo, protože tyto již neplatné IFCC metody stejně nebyly pro rutinní klinické laboratoře dostupné ve formě komerčních kitů.

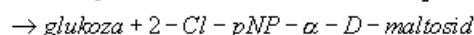
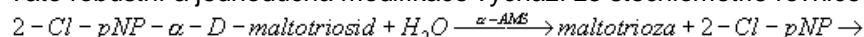
Dle vyjádření expertů IFCC, WG-CCE (panel enzymy) je možno nové normované postupy očekávat nejdříve počátkem roku 2003, komerčně dostupné přípravy pak ještě o něco později. Teprve situace, kdy budeme mít k dispozici soupravu složením odpovídající mezinárodně normované metodě (nové metodě dle IFCC pro 37 °C) a sérový kalibrátor s úplnou návazností na certifikovaný kalibrační materiál vyššího řádu (7,8), umožní definitivní řešení této problematiky.

V přechodné době máme v podstatě jen jednu možnost:

1. Mít k dispozici zatím soupravu principiálně (substrát) odpovídající některé mezinárodně normované metodě (např. neplatné metodě dle IFCC, 30° C).
2. Kalibrační funkci získat pomocí primárního standardního roztoku pNP.
3. Kalibrační funkci získat či odvodit od nového dostupného certifikovaného referenčního materiálu **CRM IRMM/IFCC-456 α -AMS**

Zatím stále používanou, byť nově nedoporučenou (Doporučení WG-CCE IFCC z léta 2002) metodickou modifikací ke stanovení k.k. α -amylázy je i **adaptace dřívější IFCC metody za užití substrátu 2-chloro-4-nitrofenyl- α -D-maltotriosidu (původně pro 30 °C) jako přímé rutinní metody pro stanovení k.k. α -amylázy při 37 °C tak, jak ji provedl prof. K.Lorentz (5, 6).**

Tato robustní a jednoduchá modifikace vychází ze stechiometrie rovnice a konverze na maltotriózu:



a fotometrického sledování žlutého zbarvení reakčního produktu 2-chloro-4-nitrofenoxidu při $\lambda = 405$ nm.

Dostupný referenční materiál

Stav k datu vzniku textu (rok 2002).

Až do roku 2001 nebyl k dispozici certifikovaný referenční materiál (CRM) pro stanovení k.k. α -AMS, a proto ani nebylo možné utvořit nepřerušovaný řetězec návaznosti k CRM a žádat výrobce diagnostik, aby v souladu s normou IVD (7) odvozovali své kalibrační a kontrolní materiály právě od tohoto CRM. V současnosti je již k dispozici (8) certifikovaný referenční materiál IRMM/IFCC-456 s deklarací k.k. α -amylázy stanovené pomocí IFCC referenční metody při 37 °C a to

včetně definované nejistoty. Praktický přínos této skutečnosti je ale nyní ještě nevyužitelný, neboť dle aktuálních vědomostí žádný z komerčních přípravků na trhu ještě nedokládá prokazatelně plnou návaznost na tento CRM. Jeho charakterizaci uvádí **tabulka 1**.

Pro problematiku tohoto textu je podstatný jediný fakt, promítající se příznivě do získání kalibrační funkce pomocí primárního roztoku pNP i do současných možností rutinního provozu:

Přechod na reakční teplotu 37 °C má při zvoleném pH reakční směsi pozitivní vliv na disociaci (pK) 4-nitrofenolu a současně se minimalizuje vliv proteinové matrice na pK, k čemuž přispívá i použitý PIPES pufr referenční metody. Pro deklaraci α -amylázy v CRM tak mohl být použit průměrný molární absorpční koeficient 4-nitrofenolu, získaný pro vodné i proteinové prostředí ($\epsilon = 1012 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$).

Praktickým přínosem je také vhodnost kalibračního materiálu pro stanovení v moči i krevním séru, zjednodušení kalibrace i modifikovaným postupem za použití primárního standardního roztoku pNP v případě práce s diagnostickým kitem založeným na nové standardizované metodě IFCC pro teplotu 37 °C.

Tabulka 1:

Certifikovaný referenční materiál CRM IRMM/IFCC-456 α -AMS
 α -amyláza stanovená referenční metodou IFCC při 37 °C

	Certifikovaná hodnota	Kombinovaná rozšířená nejistota ($k = 2$) stanovená dle GUM	Akceptované soubory dat výsledků referenčních laboratoří
Katalytická koncentrace α -AMS v rozpuštěném kontrolním materiálu CRM (stanovení IFCC metodou při teplotě 37 °C)	9,1 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$	$\pm 0,3 \mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$	7
CRM byl vyroben a certifikován v úzké spolupráci mezi IRMM a IFCC (pracovní skupina pro kalibrátory v klinické enzymologii – WG-CCE)			

Pro měření byla použita výše uvedená metoda EPS-G7 dle IFCC v referenčním provedení při teplotě 37 °C. Pro určení molárního absorpčního koeficientu byl použit roztok 4-nitrofenolu v 0,01 mol NaOH Sigma se stanoveným $\epsilon_{401 \text{ nm}} = 1840 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. Ke kalibraci měření byl použit vodný roztok 4-nitrofenolu po nastavení pH = 7,00 se stanoveným $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 1012 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ jak je i uvedeno výše. K získání enzymu pro účely certifikace bylo použito lidského pankreatu, aby zůstal zachován optimální poměr slinného a pankreatického izoenzymu α -AMS.

Materiál CRM je v lyofilizované formě v zatavených ampulích o obsahu 1 mL po naředění. Neředěný referenční materiál se uchovává při -20 °C. Naředěný materiál může být skladován při -4 °C po dobu maximálně 3 měsíců. Ředění se provádí přesně dle doporučeného postupu. Je definována komutabilita ve vztahu neředěný – ředěný referenční materiál. CRM obsahuje při dodání kompletní dokumentaci certifikace dle IVD (evropská legislativa) (7) a určení způsobu práce s certifikovaným referenčním materiálem včetně jeho rozpouštění a stability.

Referenční materiál je určen k referenčním měřením α -AMS, ke kalibraci, ke stanovení nepřerušovaného řetězce návaznosti, k přípravě kontrolních a kalibračních materiálů výrobců diagnostik a kitů dle evropské legislativy a obecně k přípravě kalibračních a kontrolních materiálů v souladu s doporučením IVD (7).

Poznámka

Stav k datu revize textu (rok 2019).

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]

Metodiku akceptovali všichni významní producenti IVD, je masově provozována celosvětově a splnila úlohu harmonizace výsledků, což dokladují všechny zavedené systémy EHK, SEKK nevyjímaje.

Dostupný referenční materiál

Stav k datu revize textu (rok 2019).

V současné době je k dispozici certifikovaný referenční materiál CRM IFCC/IRMM 456 α -amylase. 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>

Obecný návod postupu kalibrace

Níže je uveden obecný návod postupu kalibrace "otevřeného" analyzátoru při stanovení katalytické koncentrace α -AMS pomocí primárního kalibračního roztoku.

1. Příprava kalibrace dvoučinnidlových postupů s R1, R2 (start substrátem)

A) Úprava aplikačního programu (SW):

Aplikační program dosud užívaný pro stanovení příslušného enzymu (α -AMS) musí splňovat co nejvíce podmínky definované pro manuální postup.

Není-li tomu tak, upravte všechny volitelné parametry automatizovaného pracovního postupu. Kompromisní volbu lze připustit jen v případech snížené flexibility použité instrumentace, a to pouze u parametrů, které neovlivňují zásadním způsobem vlastní měření, nebo jejich vliv eliminujeme zvoleným specifickým postupem kalibrace. Kontrola reakční teploty je prvořadá (viz [poznámka č. 9](#)).

Obecně i v případě α -AMS je nutno dodržet objemový poměr sérum/reakční směs.

Takto korigovaný aplikační program užívaný pro stanovení příslušného enzymu v režimu kalibrace se sérovým kalibrátorem upravíme následovně:

1. Režim měření změníme z kinetiky (RATE) na END POINT.
2. Pipetované objemy vzorku i kalibrátorů, stejně jako dávkované objemy činidel R1 a R2 ponecháme beze změn.
3. Beze změn ponecháme i vlnovou délku fotometrie. (Nejlépe absorpční maximum či vynucený kompromis dle bodu A, v případě bichromatického měření primární i vhodně volenou sekundární vlnovou délku).
4. U komfortnějších SW zvážíme úpravu kritérií pro absorbance BLANKu, SD, DUPLICAT LIMIT, SENZITIVITY LIMIT atp.

B) Přepočítání koncentrace kalibračního roztoku na vyjádření odpovídající aktivity stanovovaného enzymu:

Vyjdeme ze znalosti dvou předpokladů:

1. Definice jednotky katalytické aktivity – katal (kat) a z ní odvozené jednotky mikrokatal (μ kat)
2. Znalosti měřicího režimu konkrétního analyzátoru (vyjadřování a použití ΔA v kalibračním režimu)

Příklad pro α -AMS:

(Jako kalibrační roztok bude použit roztok 4-nitrofenolu, coby reakční produkt)

Pokud jako standard použijeme roztok pNP o koncentraci $2,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ 4-nitrofenolu (pNP) (vlastní příprava: $0,006677 \text{ g}$ 4-nitrofenolu a $0,01 \text{ g}$ disodné soli kyseliny etyléndiamintetraoctové (EDTA) rozpustíme v destilované vodě, doplníme do 200 mL), platí:

ad 1) $\mu\text{kat} = \mu\text{mol/L/s}$ (přeměna $1 \mu\text{molu}$ za sekundu) - oficiální definice jednotky: $1 \mu\text{kat/L} = 10^3 \text{ mol/s/m}^3$

ad 2) použitý analyzátor např. při režimu RATE vyjadřuje $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ (správněji $\frac{\Delta A}{60\text{s}}$)

pak: $2,4 \text{ mmol/L} = 2400 \mu\text{mol/L}$ pNP a to odpovídá katalytické koncentraci $2400/60 = 40,00 \mu\text{kat/L}$

Do SW analyzátoru zadáme koncentraci standardu jako: S2 CONC. = $40,00 \mu\text{kat/L}$. To platí pouze pro případ práce s kitem (IFCC) obsahujícím bifunkční (bakteriální) glukosidázu, zabezpečující stechiometrii: substrát/pNP = 5/5

C) Úprava konfigurace činidel a kalibračních roztoků v analyzátoru:

Zásadně použijeme v analyzátoru pouze čerstvě připravená činidla (viz [poznámka č. 12](#)), totéž platí o standardním roztoku pNP (viz [poznámka č. 2](#))!

- Činidlo R1 (pufr) ponecháme stejně jako pro rutinní provoz.
- Činidlo R2 (substrát) ponecháme stejně jako pro rutinní provoz.
- Blank: 0,9 % NaCl (pouze pro kalibraci α -AMS v moči)
- Blank: 0,9 % NaCl s modelovanou maticí cca 67 g/l proteinů (pouze pro kalibraci α -AMS v séru)
- Jako standardní roztok použijeme v případě stanovení v moči roztok pNP o koncentraci $2,4 \text{ mmol/L}$ 4 nitrofenolu (pNP)
- Jako standardní roztok použijeme v případě stanovení v moči roztok pNP o koncentraci $2,4 \text{ mmol/L}$ 4 nitrofenolu (pNP) v roztoku proteinu (s obsahem cca $67,0 \text{ g/L}$)

Příklad použití komerčních přípravků pro přípravu kalibračního roztoku s proteinovou maticí:

1. Příprava standardu:

$2,4 \text{ mmol.L}^{-1}$ pNP (ERBA-Lachema) smícháme v poměru 1+1 s roztokem albuminu, který připravím rekonstitucí obsahu lahvičky Albumin z BLT Bilirubin Standard (ERBA-Lachema) přidávkem $1,0 \text{ mL}$ destilované vody.

2. Příprava blanku:

K obsahu lahvičky Albumin z BLT Bilirubin Standard (ERBA-Lachema) přidáme $2,0 \text{ mL}$ 0,9 % NaCl (V/V).

Do SW analyzátoru zadáme koncentraci standardu jako: S2 CONC. = $20,00 (\mu\text{kat/L})$, to pro případ práce s kitem IFCC obsahujícím bifunkční (bakteriální) glukosidázu, zabezpečující stechiometrii: substrát/pNP = 5/5

2. Vlastní kalibrace dvoučinidlových postupů s R1, R2 (start substrátem)

D) Dvoubodová kalibrace (Blank + Standard) v režimu END POINT:

- Spustíme dvoubodovou kalibraci analyzátoru (BLANK-S1 a STANDARD-S2).
- Analyzátor poskytne hodnotu kalibračního faktoru F. Takto získaný F lze použít pro rutinní provoz, zohledňuje všechny vlivy použité instrumentace (zahrnuje INSTRUMENT FACTOR) (pipetování, dávkování, objemové poměry, fotometrii - vlnovou délku (y), optickou dráhu - kyvetu, navíc též použitý typ glukosidázy, typ a složení pufrací směsi, pH, maticí proteinů atd.).

E) Korekce kalibrace:

- Aplikační program upravíme zpět do původního stavu (tj. režim RATE + odstraníme případně další provedené změny dle bodu A 4).
- Jednobodovou kalibraci analyzátoru (pouze BLANK!) **není třeba provádět**. Analyzátor již hodnotu korekce na

samovolný rozpad substrátu, zohlednil. Touto hodnotou $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ pro BLANK bude korigovat všechna rutinní měření. Kalibrační faktor F získaný v bodě D) neměníme.

3. Rutinní stanovení dvoučinidlovým postupem s R1, R2 (start substrátem)

F) Úprava aplikačního programu pro rutinní provoz:

- Nutná je zpětná úprava aplikace, tj. dle bodu E.
- Je vhodné upravit aplikační SW do modifikace práce s kalibračním faktorem F a zakázat kalibraci v režimu RATE.
- Kalibrační funkce získaná tímto modifikovaným postupem je vhodná pro rutinní provoz, kontrolu nejasných a blíže nespecifikovaných deklarácí katalytických koncentrací (aktivit) enzymů v neproověřených kontrolních a kalibračních materiálech. Je individuálně platná pro použitý analyzátor a kit. Správně provedená se může stát nástrojem unifikace s některými přednostmi oproti použití sérového enzymového kalibrátoru.

Upozornění (závislé na typu analyzátoru):

Je nutno dodržet zadání koncentrace BLANKU (0,00) i pNP při kalibraci na stejný počet desetinných míst jako při rutinním provozu (řídíme se pravidlem, která koncentrace určuje u daného analyzátoru počet desetinných míst ve výsledku). Jinak obdržíme faktor F s řádovou odlišností!

Poznámky:

1. Kalibrace s kalibračním roztokem je sice provedena v dubletu, tripletu či dle volby u konkrétního typu analyzátoru, přesto je vhodné kalibraci provést opakovaně, z obdržených F použít průměr.
2. Pozor, standardní roztok pNP se na vzduchu oxiduje, proto při kalibraci používejte jen čerstvý pNP, právě otevřenou ampuli pNP, minimalizujte časovou expozici standardního roztoku v otevřeném kepu.
3. Kalibraci s kalibračním roztokem je vhodné či nutné opakovat v případě servisních zásahů do fotometrické, pipetovací či dávkovací jednotky (výměna halogenové lampy, čištění optiky atp.), rovněž při případné SW změně pipetovaných a dávkovaných objemů v aplikaci.
4. Podmínkou nutnou pro získání adekvátní kalibrační funkce je, stejně jako v případě kalibrace pomocí sérových kalibrátorů, dobrý technický stav analyzátoru ve smyslu opakovatelnosti (reprodukovatelnosti) měření. Nástroje pro kontrolu tohoto parametru máme u analyzátorů běžně k dispozici.
5. Kalibraci s kalibračním roztokem není nutné opakovat v poměrně dlouhém časovém intervalu, ve kterém analyzátor vykazuje dobrou reprodukovatelnost.
6. Ke kalibraci lze, kromě komerčních roztoků dodávaných některými výrobci, použít i vlastní roztoky připravené pomocí vlastních navážek.
7. Dostatečně čistá surovina pro přípravu kalibračního roztoku je nutnou podmínkou. (4-nitrofenol by měl mít molární absorpční koeficient $\epsilon = 1838,0 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{m}^2$ měřeno jako jeho absorbance v 10 mmol/L roztoku NaOH při $\lambda = 401 \text{ nm}$ a teplotě 20 °C). Je nutno počítat s omezenou stabilitou, disociačními konstantami, pH a dalšími limitujícími vlivy v jednotlivých konkrétních případech kalibračních roztoků. Z tohoto důvodu lze i preferovat komerčně dodávané přípravky (je zde zohledněn účel použití; v přípravě je i plnění pod dusíkovou atmosférou, bezuzávěrové obaly - ampule).
8. Nutná je i vhodná volba koncentrace použitého kalibračního roztoku tak, aby v daném režimu kalibrace poskytoval optimální odezvu fotometrického signálu. (Pro stanovení katalytické koncentrace α -AMS např. 2,4 mmol/L pNP – ampule ERBA-Lachema.
9. Podmínkou platnosti kalibrace je dodržení reakční teploty shodné pro kalibraci kalibračním roztokem i rutinní stanovení a současně deklarovanou hodnotu teploty pro referenční interval, tj. $t = 37 \text{ °C}$. Je nutné prověřit teplotu měření v kyvetě (inkubační lázni) nejen na obrazovce analyzátoru, ale i vlastním měřením pomocí přesného teploměru s požadovanou přesností na minimálně $\pm 0,1 \text{ °C}$, což je plně v našich možnostech i možnostech analyzátorů. Teplota má vliv nejen na rychlost reakce (pro RATE), ale i na molární absorpční koeficient pNP (pro END POINT i RATE), rovněž na pH reakční směsi v obou případech. Případný větší rozdíl reakční teploty je nepřijatelný a je nutno jej řešit servisním zásahem.
10. Pokud systém vnitřního řízení jakosti signalizuje trend v odchylce od cílových hodnot, opakujeme kalibraci.
11. Pokud opakovaná kalibrace neřeší problémy vnitřního řízení jakosti, jedná se zpravidla o závadu v kvalitě používaných činidel (viz [poznámka č. 12](#)).
12. V případě AMS kitů:
U R1 a R2 činidel mnoha výrobců je časté různé pH, výsledné pH je modelováno až v kyvetě. V nádobkách na palubě analyzátoru může docházet ke změně pH, což má dramatický vliv na změnu disociace 4-nitrofenolu. Proto jsou údaje výrobce o stabilitě činidel závazné, i když zdánlivá použitelnost se jeví delší (viz [poznámka č. 13](#))!
13. Systém interního řízení jakosti v případě použití této kalibrační metody s relativně dlouhodobě neměnným F podstatně citlivěji signalizuje měnící se kvalitu činidel (viz [poznámka č. 12](#)), než jsme byli zvyklí při kalibraci přes sérový kalibrátor. Tam jsme častou rekalibrací "zdánlivě vylepšili" kalibrační funkci. Jakákoliv změna činidel však představuje stav, kdy již nepracujeme standardizovanou metodou, ale její blíže nedefinovanou modifikací! Změna kalibračního faktoru, nepodložená změnou reakční teploty (viz [poznámka č. 9](#)) či změněným technickým stavem analyzátoru, signalizuje zpravidla změnu (viz [poznámka č. 12](#)) reakčních podmínek (pH, atp. pro R1, rozložený substrát pro R2) a je jasným signálem obrátit naši pozornost tímto směrem. Stabilita substrátu (pro α AMS) je kritická i z jiného pohledu, poněvadž během jeho stárnutí se snižuje měrný rozsah stanovení. Tento problém lze ošetřit v SW většiny analyzátorů kontrolou absorbance REAGENT BLANKU, kontrola kvality pufru R1 ale zůstává vždy jen na obsluze.
14. Ani "uzavřené" analytické systémy nejsou bez šance aplikovat tento modifikovaný postup kalibrace. V zásadě jsou dvě možnosti:
 - a. K výpočtu kalibračního faktoru použít výpis naměřených absorbancí z režimu kalibrace, kdy ponecháme firemní SW aplikaci (včetně režimu RATE) a provedeme pouze potřebnou výměnu činidel (R2, standard pNP), výpočet F manuálně, korekci na BLANK již na rutinní aplikaci.

- b. Ve firemních aplikacích vyhledáme vhodnou aplikaci END POINT pro jiný analyt, kde zajistíme shodu pipetovaných a dávkovaných objemů, vlnových délek atd., kterou využijeme pro pomocnou kalibraci.

Závěr

- Z uvedeného jasně vyplývá poměrně univerzální použitelnost kalibračního postupu za použití primárního kalibračního roztoku, který bude zohledňovat proteinovou matici. Postup je i nástrojem řešení např. pro zajištění "souběhu" dvou analyzátorů v rutinním provozu s paralelním spektrem prováděných metod (statimový a rutinní přístroj), poněvadž takto lze určit obecně platný korekční INSTRUMENT FACTOR atd.
- Cílem není náhrada dnes již zavedených rutinních sérových enzymových kalibrátorů, nýbrž získání na nich nezávislého exaktního kalibračního postupu pro analyzátor, který nám umožňuje provedení kalibrace tak, jak jsme to mohli provádět jen v době převážně manuálních postupů měření.
- Je na každém analytikovi, aby se znalostí "svého" analyzátoru aplikoval výše uvedený obecný postup kalibrace a využil tak získanou "částečnou nezávislost" na sérových enzymových kalibrátorech ku prospěchu svého pracoviště. Výše uvedený postup pak též umožňuje vhodně kombinovat oba kalibrační postupy (kalibrace pomocí standardního roztoku a kalibrace pomocí sérových enzymových kalibrátorů).
- Eventuální další informace k postupům kalibrace rád poskytne autor textu.

Praktický příklad pro analyzátor HITACHI 911

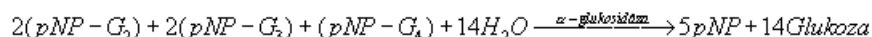
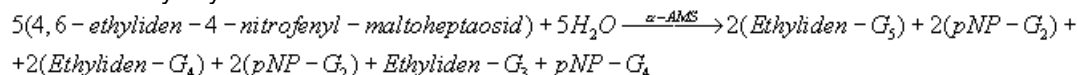
KALIBRACE HITACHI 911

Kit: BIO-LA-TEST, ERBA-Lachema,

alfa – AMYLASA, (AMY 250), kat. č.: BLT00007

Princip metody:

Modifikovaný p-nitrofenylmaltoheptaosid je blokový na konci molekulového řetězce ethylidenovou skupinou, aby při stanovení nedocházelo k jeho odbourávání exoenzymy, jako je glukó-amyháza a glukóoxidáza. Po rozštěpení oligosacharidového řetězce působením α -amyházy se ze štěpů působením glukosidázy uvolní žluté barvivo- 4-nitrofenol (pNP). Štěpení substrátu na monitorovaný pNP probíhá díky použité bifunkční α -glukosidáze v ekvimolárním poměru. Přírůstek absorbance, měřený kineticky při 405 nm je přímo úměrný aktivitě α -amyházy.



Příprava činidel:

R 1: Pufrovaný enzym: Lahvička s činidlem č.1 přímo k použití.

Stabilita: Neotevřený, při teplotě 2 až 8 °C je stabilní ve tmě do expirace kitu.

R 3: Pufrovaný substrát: Lahvička s činidlem č.2 přímo k použití.

Stabilita: Neotevřený, při teplotě 2 až 8 °C je stabilní ve tmě do expirace kitu.

Kalibrace:

1. Pomocí 1,2 mmol.L⁻¹ roztoku pNP (4-nitrofenolu)

Příprava: 2,4 mmol.L⁻¹ pNP (ERBA-Lachema) smícháme v poměru 1+1 s roztokem albuminu, který připravím rekonstitucí obsahu lahvičky Albumin z BLT Bilirubin Standard (ERBA-Lachema) přídatkem 1,0 mL destilované vody.

2. Blank: 0,9 % NaCl (V/V)

Příprava: K obsahu lahvičky Albumin z BLT Bilirubin Standard (ERBA-Lachema) přidám 2,0 mL 0,9 % NaCl. (V/V).

Postup kalibrace stanovení v séru:

1. **Aplikační program (*)** upravíme do následujícího tvaru **viz (**)**

2. Činidlo R1 (Puf) i R3 (Pufrovaný substrát) ponecháme v analyzátoru (jedině tím dosáhne výsledné pH totožné v kalibrační i rutinní reakční směsi, kalibrační metoda "standardním přídatkem")

3. Přepočítáme koncentraci pNP na odpovídající katalytickou koncentraci: pro pNP o koncentraci 1,2 mmol/L včetně 80 g/L albuminu, zadáme S2 CONC. = 20,00 (μkat.L⁻¹)

4. Blank: 0,9 % NaCl s obsahem 80 g/L albuminu

5. Provedeme dvoubodovou kalibraci, H-911 poskytne hodnotu kalibračního faktoru F. Takto získaný F, zohledňuje všechny vlivy použité instrumentace H-911 (pipetování, dávkování, objemové poměry, fotometrii-vlnovou délku, kyvetu atd.) navíc zohledňuje aktuální výsledné pH reakční směsi i změnu molární absorptivity pNP v přítomnosti proteinů při $pH \approx 7,15$

6. **Aplikační program upravíme na (***)**

7. Jednobodovou kalibraci - pouze pro BLANK, jak bylo použito v případě stanovení k.k. ALP, již neprovádíme. Díky modifikaci "standardního přídatku" 4-nitrofenolu do reakční směsi s obsahem substrátu je již korekce na samovolný rozpad substrátu obsažena v získané kalibrační závislosti dle bodu 5

Postup kalibrace stanovení v moči:

Pro stanovení AMS v moči postupujeme obdobně jako pro sérum, ale nepracujeme s modelací proteinového prostředí v kalibračních materiálech. V rutíně je ale nepraktické provozovat dvě metody, odděleně pro stanovení v moči a v séru i když by to exaktnost podmínek vyžadovala. Prakticky to řešíme buď zanedbáním dosahované negativní chyby

v případě stanovení U_AMS metodou kalibrovanou pro S_AMS, nebo provedeme dodatečnou korekci ze znalosti změn molární absorptivity 4-nitrofenolu v závislosti na obsahu proteinů v reakčním prostředí:

$$U_AMS \text{ (močová kalibrace)} = 1,0312 \times S_AMS \text{ (sérová kalibrace)}$$

Upozornění:

- Nutné je dodržet zadání koncentrace BLANKU (0,00) na stejný počet desetinných míst jako při rutinním stanovování α -AMS! Jinak obdržíme faktor F s řádovou odlišností!!
- Kalibrace dle bodu 5) je sice provedena v dubletu, přesto je vhodné kalibraci provést opakovaně a z obdržených F použít průměr.
- Kalibrace dle bodu 5) poskytne F, který je dlouhodobě platný, nicméně je vhodné kalibraci provádět opakovaně v závislosti na výsledcích QC. Odchyłka je však většinou způsobena sníženou kvalitou činidel v analyzátoru (změna pH u R1a R3, samovolný rozklad substrátu R3).
- Kalibraci dle bodu 5) je nutné opakovat v případě servisních zásahů do fotometrické, pipetovací či dávkovací jednotky (výměna halogenové lampy, čištění optiky atp.), rovněž při případné SW změně pipetovaných a dávkovaných objemů v aplikaci.
- Kalibraci dle bodu 5) není nutné opakovat v poměrně dlouhém časovém intervalu, ve kterém analyzátor vykazuje dobrou opakovatelnost (reprodukovatelnost) měření v sérii.
- Ke kalibraci doporučen komerční roztok pNP, dodává PLIVA- Lachema.
- S1 ABS.LIMIT – umožňuje hlídání použitelnosti R3 (samovolného rozpadu substrátu stárnutím).
- Stabilita pH R1 a R3 mezi šaržemi i při stárnutí v otevřené lahvičce ON BOARD je kritická pro měřenou absorpenci pNP v reakční směsi a to jak v případě vlastního stanovení, tak i při simulaci reakční směsi při kalibraci pomocí standardního roztoku pNP.
- pH je kritické jak pro rychlost enzymatické reakce, tak i pro disociaci pNP ($pK = 7,17$)
- Praktické je naprogramovat kalibrační režim α -AMS na jiném kanále, získaný F a ΔA BLANKU přepsat do rutinní aplikace.
- Nedosažení uspokojivých výsledků hodnot VKK je prakticky téměř vždy způsoben expirací a ukončením použitelnosti činidel.

(*) Příklad rutinní aplikace, kalibrace pomocí sérového kalibrátoru:

HITACHI 911											
CHEMISTRY PARAMETERS											
TEST	[AMS]	##	TEST	NAME	[AMS]	UNIT	[ukat/l]				
DATA MODE	[ON BOARD]		REPORT	NAME	[Amylase]						
QC RUN INTERVALL	[#]			Instrument Factor		(Y=aX+b) a	[1.000]				
						b	[0.000]				
EXPECTED VALUE			< SERUM >				EXPECTED VALUE < URINE >				
AGE		M		F							
[100]	[Y]	[0]	- [100]	[0]	- [100]	[0]	- [16,67]				
[100]	[Y]	[0]	- [100]	[0]	- [100]						
		[0]	- [1.67]	[0]	- [1.67]						
TECHNICAL LIMIT			< SERUM >				< URINE >				
			[0]	- [36,60]	[0]	- [36,60]					
STD	CONC	POS.	SAMPLE	PRE.	DIL.	CALIB.	Lot.No.	QUALITATIVE	[NO]		
(1)	[0.00]	#	[4]	[0]	[0]	[017]	000001	(1)	[0]	[]	
(2)	[*]	#	[4]	[0]	[0]	[#]	000002	(2)	[0]	[]	
(3)	[]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(3)	[0]	[]	
(4)	[]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(4)	[0]	[]	
(5)	[]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(5)	[0]	[]	
(6)	[]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(6)	[0]	[]	

TEST	[AMS]									
ASSAY CODE	[Rate-A]	[10]	[]		WAVELENGTH	(2 nd / Primary)	[700] / [413]			
					(660/415)					
ASSAY POINT	[25]- [31]	-[0] - [0]			Diluent/Rgt/Stability	[0301] / [#]				
		< SERUM >			< URINE >					
S.VOL (NORMAL)	[4]	[0]	[0]	[20]	[8]	[100]				
S.VOL (DECREASE)	[2]	[0]	[0]	[20]	[4]	[100]				
S.VOL (INCREASE)	[8]	[0]	[0]	[4]	[0]	[0]				
ABSLIMIT	[10000]				[10000]				[INCREASE]	
PROZONE LIMIT	[0]				[0]				[LOWER]	
REAGENT	R1 [200]	[0]	[##]	[0]						
	R2 [0]	[0]	[##]	[0]						
	R3 [50]	[0]	[##]	[0]						
	R4 [0]	[0]	[##]	[0]						
Calibration Type	[LINEAR]	[2]	[2]	[0]	[]					
AUTO TIME OUT	BLANK	[0]			SD LIMIT	[0.1]				
	SPAN	[0]			DUPLICATE LIMIT	[20]				
	2 POINT	[0]			SENSITIVITY LIMIT	[0]				
	FULL	[0]			S1 ABS. LIMIT	[-32000] [32000]				
AUTO CHANGE OF LOT	[CANCEL]				COMPENSATED LIMIT	[]				
CHANGE OF BOTTLE	[CANCEL]									

Volí uživatel

* Zadáme deklarovanou hodnotu použitého kalibrátoru (IFCC)
 ## Volí uživatel v rozsahu 00361-00400 pro volně programovatelné metody
 Diluent 00301 = 0,9 % NaCl (V/V)

(**) Modifikace pro kalibraci s pNP (1,2 mmol.L⁻¹ + proteinová matrice, např. minimálně roztok 30 g.L⁻¹ albuminu)

HITACHI 911										
CHEMISTRY PARAMETERS										
TEST	[AMS]	##	TEST	NAME	[AMS]	UNIT	[ukat/l]			
DATA MODE			[ON BOARD]	REPORT	NAME	[Amylase]				
QC RUN INTERVALL		[#]			Instrument Factor	(Y=aX+b) a	[1.000]			
						b	[0.000]			
EXPECTED VALUE			< SERUM >			EXPECTED VALUE			< URINE >	
AGE		M		F						
[100]	[Y]	[0]	-	[100]	[0]	-	[100]	[0]	-	[16,67]
[100]	[Y]	[0]	-	[100]	[0]	-	[100]			
		[0]	-	[1.67]	[0]		[1.67]			
TECHNICAL LIMIT			< SERUM >			< URINE >				
			[0]	-	[36,60]	[0]	-	[36,60]		
STD	CONC	POS.	SAMPLE	PRE.	DIL.	CALIB.	Lot.No.	QUALITATIVE	[NO]	
(1)	[0.00]	#	[4]	[0]	[0]	[017]	000001	(1)	[0]	[]
(2)	[20.00]	#	[4]	[0]	[0]	[#]	000002	(2)	[0]	[]
(3)	[]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(3)	[0]	[]
(4)	[]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(4)	[0]	[]
(5)	[]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(5)	[0]	[]
(6)	[]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(6)	[0]	[]

TEST	[AMS]				WAVELENGTH	(2 nd / Primary)	
ASSAY CODE	[1POINT]	[10]	[]		(660/415)	[700] / [415]	
ASSAY POINT	[19]-	[0]	-[0]	-[0]	Diluent/Rgt/Stability	[0301] / [#]	
			< SERUM >		< URINE >		
S.VOL (NORMAL)	[4]	[0]	[0]	[20]	[8]	[100]	
S.VOL (DECREASE)	[2]	[0]	[0]	[20]	[4]	[100]	
S.VOL (INCREASE)	[8]	[0]	[0]	[4]	[0]	[0]	
ABSLIMIT	[10000]				[10000]		[INCREASE]
PROZONE LIMIT	[0]				[0]		[LOWER]
REAGENT	R1	[200]	[0]	[##]	[0]		
	R2	[0]	[0]	[##]	[0]		
	R3	[50]	[0]	[##]	[0]		
	R4	[0]	[0]	[##]	[0]		
Calibration Type	[LINEAR]	[2]	[2]	[0]	[]		
AUTO TIME OUT	BLANK	[0]			SD LIMIT	[0.1]	
	SPAN	[0]			DUPLICATE LIMIT	[200]	
	2 POINT	[0]			SENSITIVITY LIMIT	[0]	
	FULL	[0]			S1 ABS. LIMIT	[-32000] [32000]	
AUTO CHANGE OF LOT	[CANCEL]				COMPENSATED LIMIT	[]	
CHANGE OF BOTTLE	[CANCEL]						

Volí uživatel
 ## Volí uživatel v rozsahu 00361-00400 pro volně programovatelné metody
 Diluent 00301 = 0,9 % NaCl (V/V)

(***) Modifikace pro následný rutinní provoz

HITACHI 911											
CHEMISTRY PARAMETERS											
TEST	[AMS]	##	TEST	NAME	[AMS]	UNIT	[ukat/l]				
DATA MODE	[ON BOARD]	REPORT	NAME	[Amylase]							
QC RUN INTERVALL	[#]	Instrument Factor	(Y=aX+b)	a	b	[1,000]	[0,000]				
EXPECTED VALUE	< SERUM >					EXPECTED VALUE	< URINE >				
AGE	M	F									
[100]	[Y]	[0]	-	[100]	[0]	-	[100]	[0]	-	[16,67]	
[100]	[Y]	[0]	-	[100]	[0]	-	[100]				
		[0]	-	[1,67]	[0]	-	[1,67]				
TECHNICAL LIMIT	< SERUM >					< URINE >					
		[0]	-	[36,60]	[0]	-	[36,60]				
STD	CONC	POS.	SAMPLE	PRE.	DIL.	CALIB.	Lot.No.	QUALITATIVE	[NO]		
(1)	[]		[10]	[0]	[0]	[017]	000001	(1)	[0]	[]	[]
(2)	[]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(2)	[0]	[]	[]
(3)	[]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(3)	[0]	[]	[]
(4)	[]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(4)	[0]	[]	[]
(5)	[]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(5)	[0]	[]	[]
(6)	[]		[10]	[0]	[0]	[##]	000000	(6)	[0]	[]	[]

TEST	[AMS]										
ASSAY CODE	[Rate -A]	[10]	[]	WAVELENGTH	(660/415)	(2 nd / Primary)	[700] / [415]				
ASSAY POINT	[25]- [31]	-[0] - [0]	< SERUM >	Diluent/Rgt/Stability	[0301]	/	[#]				
S.VOL (NORMAL)	[4]	[0]	[0]	[20]	[8]	[100]					
S.VOL (DECREASE)	[2]	[0]	[0]	[20]	[4]	[100]					
S.VOL (INCREASE)	[8]	[0]	[0]	[4]	[0]	[0]					
ABS.LIMIT	[10000]	[10000]	[INCREASE]								
PROZONE LIMIT	[0]	[0]	[LOWER]								
REAGENT	R1	[200]	[0]	[##]	[0]						
	R2	[0]	[0]	[##]	[0]						
	R3	[50]	[0]	[##]	[0]						
	R4	[0]	[0]	[##]	[0]						
Calibration Type	[LINEAR]	[0]	[0]	[0]	[]						
AUTO TIME OUT	BLANK	[0]	SD LIMIT	[0,1]							
	SPAN	[0]	DUPLICATE LIMIT	[20]							
	2 POINT	[0]	SENSITIVITY LIMIT	[0]							
	FULL	[0]	S1 ABS. LIMIT	[-32000] [32000]							
AUTO CHANGE OF LOT	[CANCEL]	[CANCEL]	COMPENSATED LIMIT	[]							
CHANGE OF BOTTLE	[CANCEL]	[CANCEL]									

Volí uživatel

Volí uživatel v rozsahu 00361-00400 pro volně programovatelné metody

Diluent 00301 = 0,9 % NaCl (V/V)

Seznam zkratk

CRM	Certifikovaný referenční materiál
ε	Molární absorpční koeficient
EPS	4,6-ethyliden-4-nitrofenyl- (skupina)
F	Faktor (Kalibrační faktor)
G	Glukóza
G ₁ až G ₇	Označuje glukosylové části (počítané od neredukovaného konce) oligosacharidu
GUM	Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (Eurachem 2001)
IRMM	Institute of Reference Materials and Measurements (Referenční ústav Evropské Unie v Geelu)
IVD	In vitro medical devices (7)
k.k.	Katalytická koncentrace
λ	Vlnová délka
Maltóza	4-O-α-D-glukopyranosyl-D-glukóza
n	Počet
pNP	4-nitrofenol (někdy 4-nitrofenylová skupina)
S_AMS	α-amyláza v krevním séru
SD	Směrodatná odchylka
SW	Soft-ware
VKK	Vnitřní kontrola kvality
WG-CCE	Working Group for Calibrators in Clinical Enzymology of IFCC
U_AMS	α-amyláza v moči

Literatura

- 1 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.Chem. Lab. Med. 1998; 36(3):185-203
- 2 Lorentz K.: Routine α -Amylase Assay Using Protected 4-Nitrophenyl-1,4- α -D-Maltoheptaoside and a Novel α -Glukosidase, Clin. Chem. 2000, 46:5, 644-649
- 3 Pracovní návod soupravy α -AMS Liquid, ROCHE
- 4 Sedlák P. Kalibrace katalytických koncentrací enzymových aktivit rutinních enzymů v klinické biochemii pomocí primárních standardních roztoků na autoanalyzátoch, <http://www.sekk.cz>
- 5 Lorentz K, Gütschow B, Renner F.: Evaluation of a Direct α -Amylase Assay Using 2-chloro-4-nitro-phenyl- α -D-maltotriose, Clin.Chem.Lab.Med. 1999 (11/12) 1053 – 1062
- 6 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.
- 7 Directive 98/79 EC of European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. Official Journal of the European Communities 1998 (Dec 7):L 331/1-L 331/37.
- 8 EU - IFCC Division on enzymes (WG): Certified Reference Material for α -AMS IRMM/IFCC-456, Certificate of Analysis, <http://www.irmm.jrc.be>