



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de

Buenos Aires

Argentina

Schumann, Gerhard; Aoki, Ryoji; Ferrero, Carlo A.; Ehlers, Glenn; Férand, Georges; Javier Gella, F.;
Jørgensen, Poul Jørgen; Kanno, Takahashi; Kessner, Art; Klauke, Rainer; Kytzia, Hans-Joachim;
Lessinger, Jean-Marc; Gregory Miller, W.; Nagel, Rolf; Pauwels, Jean; Schimmel, Heinz; Siekmann,
Lothar; Weidemann, Gerhard; Yoshida, Kiyoshi; Ceriotti, Ferruccio

Procedimientos primarios de referencia de la IFCC para la medición de concentraciones de actividad
catalítica de enzimas a 37 °C

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 43, núm. 3, septiembre, 2009, pp. 397-408

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires

Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53516747014>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Procedimientos primarios de referencia de la IFCC para la medición de concentraciones de actividad catalítica de enzimas a 37 °C

Federación Internacional de Química Clínica y Laboratorio Clínico (IFCC)¹⁾

División Científica, Comité sobre los Sistemas de Referencia para Enzimas (C-RSE)

Parte 8. Procedimiento de referencia para la medición de la concentración catalítica de α -amilasa

[α -Amilasa: 1,4- α -D-glucan 4-glucanohidrolasa (AMY), EC 3.2.1.1]

► Gerhard Schumann^{1,*}, Ryoji Aoki², Carlo A. Ferrero³, Glenn Ehlers⁴, Georges Férard⁵, F.-Javier Gella⁶, Poul Jørgen Jørgensen⁷, Takahashi Kanno⁸, Art Kessner⁹, Rainer Klauke¹, Hans-Joachim Kytzia¹⁰, Jean-Marc Lessinger⁵, W. Gregory Miller¹¹, Rolf Nagel¹⁰, Jean Pauwels¹², Heinz Schimmel¹², Lothar Siekmann¹³, Gerhard Weidemann¹⁴, Kiyoshi Yoshida² y Ferruccio Ceriotti³

Esta traducción fue autorizada por la IFCC.

Sin embargo, la IFCC no acepta ninguna responsabilidad por la exactitud de la misma. El documento definitivo continúa siendo el original en inglés

1) El exclusivo © para todos los idiomas y países es de propiedad de la Federación Internacional de Química Clínica y el Laboratorio Clínico.

- 1 Klinische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Alemania
- 2 Research & Development, Asahi Chemical Industry Co., Tokyo, Japan
- 3 Laboratorio Standardizzazione, Diagnostica e Ricerca San Raffaele s.p.a., Milano, Italia
- 4 Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, NY, Estados Unidos
- 5 Laboratoire de Biochimie appliquée, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, Illkirch, Francia
- 6 BioSystems, S.A., Barcelona, España
- 7 Department of Clinical Chemistry, Odense University Hospital, Odense, Dinamarca
- 8 Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University, School of Medicine, Japón
- 9 Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, Estados Unidos
- 10 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania
- 11 Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, Estados Unidos
- 12 European Commission, Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements Geel, Bélgica
- 13 Institut für Klinische Biochemie, Universität Bonn, Bonn, Alemania
- 14 Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Klinikum der Stadt, Nürnberg, Alemania

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorpora al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

Este trabajo es el octavo de una serie dedicada a los procedimientos de referencia para la medición de las concentraciones de actividad catalítica de las enzimas a 37 °C y a la certificación de las preparaciones de referencia. Otras partes se refieren a: Parte 1. El concepto de los procedimientos de referencia para la medición de las concentraciones de la actividad catalítica de las enzimas; Parte 2. Procedimiento de referencia para la medición de la concentración catalítica de creatina quinasa; Parte 3: Procedimiento de referencia para la medición de la concentración catalítica de lactato deshidrogenasa; Parte 4. Procedimiento de referencia para la medición de la concentración catalítica de alanin aminotransferasa; Parte 5. Procedimiento de referencia para la medición de la concentración catalítica de aspartato aminotransferasa; Parte 6. Procedimiento de referencia para la medición de la concentración catalítica de γ -glutamiltransferasa; Parte 7. Certificación de cuatro materiales de referencia para la determinación de la actividad enzimática de γ -glutamiltransferasa, lactato deshidrogenasa, alanin aminotransferasa y creatina quinasa a 37 °C. El procedimiento que se describe aquí se deduce a partir del método de referencia de la IFCC a 30 °C descrito previamente. Las diferencias se tabulan y comentan en Clin Chem Lab Med 2006; 44: 1146-55.

Palabras clave: α -amilasa * procedimiento de referencia de la IFCC * límites de referencia preliminares altos y bajos.

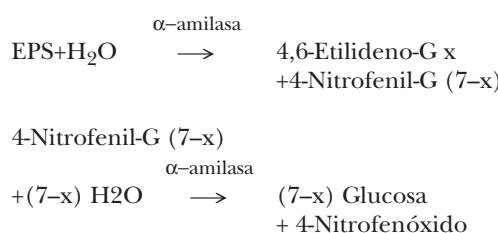
Abreviaturas: AMY, α -amilasa; EPS, 4,6-etileno (G1)-4-nitrofenil (G7)- α -(1 \rightarrow 4)-D-maltoheptósido; G, α -(1 \rightarrow 4)-D-glucopiranósil-; 4-NP, 4-nitrofenóxido; G7-4-NP, 4-nitrofenil- α -(1 \rightarrow 4)-D-maltoheptósido; IRMM, Instituto para Materiales y Mediciones de Referencia.

La Federación Internacional de Química Clínica y Laboratorio Clínico (IFCC) ha autorizado a Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana a traducir al español los documentos aprobados por los distintos Comités de la División Científica de la entidad. Esto significa una distinción para nuestra publicación pero al mismo tiempo el compromiso de transformarla en una sección permanente.

Introducción

Este trabajo es el octavo de una serie dedicada a los procedimientos de referencia para la medición de las concentraciones de actividad catalítica de las enzimas a 37 °C y a la certificación de las preparaciones de referencia (1-7).

Principio de la reacción



Especímenes

Materiales de calibración, especímenes de control y suero humano.

Condiciones de medición

Las concentraciones en la mezcla de reacción final y las condiciones de medición se listan en las Tablas I y II.

Nota: El cumplimiento con las tolerancias prescriptas para los parámetros temperatura, pH, camino óptico y longitud de onda se confirma si la incertidumbre expandida combinada de la calibración es igual a o menor que las tolerancias y si el rango de incertidumbre de la calibración se superpone con los intervalos de referencia prescriptos.

Reactivos

1. Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-etansulfónico [HEPES] ($C_8H_{18}N_2O_4S$), PM = 238,31
 2. 4,6-Etilideno(G1)-4-nitrofenil(G7)- α -(1 \rightarrow 4)-D-maltoheptósido [EPS], ($C_{50}H_{77}NO_{38}$), PM= 1300,1
 3. α -Glucosidasa (EC 3.2.1.20)
 4. Cloruro de Sodio (NaCl), PM=58,44
 5. Cloruro de cálcio dihidrato ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), PM= 147,02
 6. Solución de hidróxido de sodio (NaOH), PM=40,00, 0,2 mol.L⁻¹
 7. Albúmina de suero bovino, fracción V, PM=68000
 8. Solución acuosa de cloruro de sodio (NaCl), PM=58,44, 0,154 mol.L⁻¹
 9. Agua (grado analítico), PM=18,02

Se deben utilizar reactivos de la más alta pureza. La calidad de los reactivos tiene que ser probada por medio de certificados de análisis de los proveedores. Si se sospecha que un reactivo químico contiene impurezas que afectan la actividad catalítica del analito, se debe profundizar más en la investigación, por ejemplo, realizar comparaciones con productos de diferentes fabricantes y de diferentes lotes. Se recomienda utilizar reactivos que hayan sido testeados y aprobados en las comparaciones.

EPS: La contaminación del sustrato EPS por 4-nitrofenil- α -D-maltoheptósido (G7-4-NP) podría originar una fase prolongada de aletargamiento y podría interferir en la determinación de la concentración catalítica de la α -amilasa. La fracción de masa de G7-4-NP en EPS se limita a 0,001. Si la fracción de masa de G7-4-NP es desconocida para el usuario o no está claramente especificada en el certificado, la concentración de masa de G7-4-NP tiene que ser determinada (Ver Apéndice 2).

α -Glucosidasa: Sólo son convenientes las preparaciones enzimáticas de α -glucosidasa que separan a todas las uniones glucosídicas de los productos de re-

Tabla I. Concentraciones en la mezcla de reacción completa final para la medición de α -amilasa.

Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etansulfónico	50 mmol.L ⁻¹
pH (37 °C)	7,00±0,03
4,6-Etilideno(G1)-4-nitrofenil(G7)- α -(1→4)-D-maltoheptósido	5 mmol.L ⁻¹
Cloruro de sodio	70 mmol.L ⁻¹
Cloruro de calcio	1 mmol.L ⁻¹
α -Glucosidasa (37 °C)	135 μ kat.L ⁻¹ (8100 U.L ⁻¹)*
Fracción de volumen de la muestra	0,0323 (1:31)

* Concentración catalítica sin inhibir. *Nota:* La concentración catalítica indicada de la α -glucosidasa se medirá en la mezcla de reacción completa final si se usa una solución de cloruro de sodio de 9 g.L⁻¹ (154 mmol.L⁻¹) como muestra (sin inhibición por la matriz de la muestra).

Nota: Además de las sustancias listadas en la Tabla I, la mezcla de reacción completa contiene 0,1 g·L⁻¹ de albúmina que es originariamente un componente de la Solución 3. La presencia de albúmina en la Solución de Reacción y consecuentemente en la mezcla de reacción completa final estabiliza la α -glucosidasa.

acción de la α -amilasa (por ejemplo, del *Bacillus stearothermophilus*).

Albúmina de suero bovino: La albúmina de suero bovino que se utilice debe estar libre de proteasas, como se declara en las especificaciones del fabricante.

Calibración del pehachímetro

El coeficiente de absorción molar del indicador depende en gran medida del pH. Por lo tanto, la calibración del pehachímetro y los ajustes del pH de la solución 2 y de la solución del reactivo iniciador deben ser muy precisos. Se tienen que usar al menos dos soluciones estándares de *buffer* para el procedimiento de calibración. Las soluciones estándares de *buffer* deben tener valores certificados dentro del rango de pH 6 a

Tabla II. Condiciones para la medición de α -amilasa.

Temperatura	37,0 °C \pm 0,1 °C
Longitud de onda	405 nm \pm 1 nm
Amplitud de banda	\leq 2 nm
Camino óptico	10,00 mm \pm 0,01 mm
Tiempo de incubación	60 s
Tiempo de retraso	180 s
Intervalo de medición	180 s
Lecturas (puntos de medición)	\geq 6

pH 8 y deberán incluir el ajuste del pH de las soluciones del reactivo. La incertidumbre del pH certificado tiene que ser \leq 0,01 pH.

Nota: Se recomienda el uso de las soluciones estándares de *buffer* que contengan fosfato diácido de potasio (anhidro) y fosfato ácido de sodio (anhidro). Se

Tabla III. Dependencia respecto de la temperatura, del pH de la Solución 2

Temperatura, °C	pH	Temperatura, °C	pH	Temperatura, °C	pH
15.00	7.254	23.50	7.154	32.00	7.056
15.25	7.251	23.75	7.151	32.25	7.053
15.50	7.248	24.00	7.148	32.50	7.051
15.75	7.245	24.25	7.145	32.75	7.048
16.00	7.242	24.50	7.142	33.00	7.045
16.25	7.239	24.75	7.139	33.25	7.042
16.50	7.236	25.00	7.136	33.50	7.039
16.75	7.233	25.25	7.133	33.75	7.036
17.00	7.230	25.50	7.130	34.00	7.034
17.25	7.227	25.75	7.128	34.25	7.031
17.50	7.224	26.00	7.125	34.50	7.028
17.75	7.221	26.25	7.122	34.75	7.025
18.00	7.218	26.50	7.119	35.00	7.022
18.25	7.215	26.75	7.116	35.25	7.020
18.50	7.212	27.00	7.113	35.50	7.017
18.75	7.209	27.25	7.110	35.75	7.014
19.00	7.206	27.50	7.107	36.00	7.011
19.25	7.203	27.75	7.105	36.25	7.008
19.50	7.200	28.00	7.102	36.50	7.006
19.75	7.197	28.25	7.099	36.75	7.003
20.00	7.194	28.50	7.096	37.00	7.000
20.25	7.192	28.75	7.093	37.25	6.997
20.50	7.189	29.00	7.090	37.50	6.994
20.75	7.186	29.25	7.087	37.75	6.992
21.00	7.183	29.50	7.085	38.00	6.989
21.25	7.180	29.75	7.082	38.25	6.986
21.50	7.177	30.00	7.079	38.50	6.983
21.75	7.174	30.25	7.076	38.75	6.981
22.00	7.171	30.50	7.073	39.00	6.978
22.25	7.168	30.75	7.070	39.25	6.975
22.50	7.165	31.00	7.068	39.50	6.972
22.75	7.162	31.25	7.065	39.75	6.969
23.00	7.159	31.50	7.062	40.00	6.967
23.25	7.157	31.75	7.059		

encuentran disponibles de manera comercial soluciones *buffer* de referencia apropiadas trazables con materiales de referencia estándares nacionales o internacionales.

Nota: El coeficiente de absorción molar del indicador (4-nitrofenóxido) depende en gran medida del pH. Un desvío de 0,01 en el pH ocasiona un cambio en la cinética del 1% aproximadamente. Por consiguiente, se debe ajustar el pH de manera muy precisa.

Esquemas para el ajuste y control del pH

PROCEDIMIENTO PARA EL AJUSTE DEL pH A TEMPERATURAS QUE SE ALEJAN DE 37 °C

Tanto el termómetro como el electrodo de pH se suspenden en la solución mixta simultáneamente. La solu-

ción mezclada luego se titula al pH listado en las Tablas III y IV para la verdadera temperatura medida. La velocidad de agitación deberá ser la misma durante la calibración y el control del pehachímetro y durante el ajuste del pH de las soluciones del reactivo. El electrodo de pH debe estar ubicado en el centro de la solución mezclada. El hecho de que la temperatura puede cambiar durante la titulación debe ser tenido en cuenta. Es por eso que se debe controlar nuevamente la temperatura en la proximidad del valor de pH deseado y se debe corregir el pH de ser necesario. Lo mismo se aplica para el ajuste de la compensación de la temperatura del pehachímetro.

Preparación de las soluciones

La masa dada para los compuestos para la preparación de las soluciones se refiere al 100% del contenido.

Tabla IV. Dependencia del pH de la solución del reactivo del comienzo de la temperatura

Temperatura, °C	pH	Temperatura, °C	pH	Temperatura, °C	pH
15.00	7.270	23.50	7.165	32.00	7.058
15.25	7.267	23.75	7.162	32.25	7.055
15.50	7.264	24.00	7.158	32.50	7.052
15.75	7.261	24.25	7.155	32.75	7.049
16.00	7.258	24.50	7.152	33.00	7.046
16.25	7.255	24.75	7.149	33.25	7.043
16.50	7.252	25.00	7.146	33.50	7.040
16.75	7.249	25.25	7.143	33.75	7.037
17.00	7.246	25.50	7.139	34.00	7.034
17.25	7.243	25.75	7.136	34.25	7.032
17.50	7.240	26.00	7.133	34.50	7.029
17.75	7.237	26.25	7.130	34.75	7.026
18.00	7.234	26.50	7.127	35.00	7.023
18.25	7.231	26.75	7.124	35.25	7.020
18.50	7.227	27.00	7.120	35.50	7.017
18.75	7.224	27.25	7.117	35.75	7.014
19.00	7.221	27.50	7.114	36.00	7.011
19.25	7.218	27.75	7.111	36.25	7.008
19.50	7.215	28.00	7.108	36.50	7.006
19.75	7.212	28.25	7.105	36.75	7.003
20.00	7.209	28.50	7.102	37.00	7.000
20.25	7.206	28.75	7.099	37.25	6.997
20.50	7.203	29.00	7.095	37.50	6.994
20.75	7.199	29.25	7.092	37.75	6.992
21.00	7.196	29.50	7.089	38.00	6.989
21.25	7.193	29.75	7.086	38.25	6.986
21.50	7.190	30.00	7.083	38.50	6.984
21.75	7.187	30.25	7.080	38.75	6.981
22.00	7.184	30.50	7.077	39.00	6.978
22.25	7.181	30.75	7.074	39.25	6.976
22.50	7.177	31.00	7.071	39.50	6.973
22.75	7.174	31.25	7.068	39.75	6.970
23.00	7.171	31.50	7.064	40.00	6.968
23.25	7.168	31.75	7.061		

Si el contenido del reactivo químico empleado es menor (por ejemplo, $yz\%$), la cantidad equivalente a la masa dada se calcula usando un factor:

$$\text{Contenido F} = \frac{100}{yz}$$

Tabla V. Sistema analítico para medición de α -amilasa

2,0 mL	Solución de reacción
0,08 mL	Equilibrar a 37,0 °C
	Muestra
0,40 mL	Mezclar completamente e incubar durante 60 s. Al final del periodo de incubación, la temperatura de la solución en la cubeta debe haber alcanzado 37,0 °C.
	Solución del reactivo iniciador
	Mezclar completamente, esperar 180 s y monitorear la absorbancia durante 180 s adicionales

Las impurezas en el agua para preparación de las soluciones de reactivos para medir α -amilasa pueden producir inhibición de la actividad catalítica. Las guías que describen la preparación y la realización de pruebas del agua para reactivos se publican en algún otro sitio (9). Sin embargo, los estándares que describen la calidad del agua específicamente para las mediciones de enzimas todavía no se han definido. En el caso de sospechar la influencia del agua en la determinación de la concentración de la actividad catalítica, es necesario realizar investigaciones sistemáticas. La incertidumbre expandida ($k=2$) combinada (normalmente distribuida) de cada procedimiento de peso (inclusive la incertidumbre de la pureza de la sustancia) deberá ser $\leq 1,5\%$ y la masa en el visor de la balanza no deberá ser diferente de la masa esperada en más $\pm 0,5\%$.

SOLUCIÓN 1

6,14 g (417,5 mmol.L⁻¹) de cloruro de calcio, dihidrato.

- Disolver en aproximadamente 80 mL de agua.
- Transferir a un recipiente volumétrico de 100 mL.
- Equilibrar el recipiente volumétrico y el agua a 20 °C.
- Llenar con agua (20 °C) hasta la marca para calibración que tiene el recipiente volumétrico.

Estabilidad a 20 °C: 3 meses.

SOLUCIÓN 2

3,10 g (52,10 mmol.L⁻¹) de ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-etansulfónico

1,26 g (86,13 mmol.L⁻¹) de cloruro de sodio.

- Disolver en aproximadamente 200 mL de agua.
- Agregar 0,75 mL de la solución 1.
- Ajustar a pH (37 °C) 7,00 con 0,2 mol.L⁻¹ de solución de hidróxido de sodio.
- Transferir a un recipiente volumétrico de 250-mL.
- Equilibrar el recipiente volumétrico y el agua a 20 °C.
- Llenar con agua (20 °C) hasta la marca de calibración del recipiente volumétrico.

Estabilidad a 2-8 °C: 5 semanas.

REACTIVO DILUYENTE PARA ENZIMAS

1,20 g de albúmina bovina.

0,90 g (154 mmol L⁻¹) de NaCl.

- Disolver en aproximadamente 80 mL de agua.
- Transferir a un recipiente volumétrico de 100-mL.
- Equilibrar el recipiente volumétrico y el agua a 20 °C.
- Llenar con agua (20 °C) hasta la marca de calibración del recipiente volumétrico.

Estabilidad a 2 °C-8 °C: al menos 3 meses.

SOLUCIÓN 3

16,9 mkat.L⁻¹ (1014 kU.L⁻¹) de α -glucosidasa a 37 °C.

- Determinar la concentración catalítica de α -glucosidasa de acuerdo con el Apéndice 1.
- Reconstituir la α -glucosidasa liofilizada con un volumen del Reactivo Diluyente para Enzimas hasta obtener una concentración catalítica del material reconstituido de 16,9 mkat.L⁻¹ (1014 kU.L⁻¹) a 37 °C.
- Freezar la solución enzimática en porciones de 0,25 mL a -25 °C.

Estabilidad a -25 °C: al menos 6 meses.

SOLUCIÓN DE REACCIÓN

- Mezclar 25 mL de la solución 2 con 0,25 mL de la solución 3.

Estabilidad a 2-8 °C: 2 semanas.

SOLUCIÓN DEL REACTIVO INICIADOR

1,01 g (31,00 mmol.L⁻¹) de 4,6-etilideno(G1)-4-nitrofenil (G7)- α -(1→4)-D-maltoheptósido.

0,310 g (52,10 mmol.L⁻¹) de ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-etansulfónico.

- Disolver en aproximadamente 20 mL de agua.
- Ajustar a pH (37 °C) 7,00 con 0,2 mol.L⁻¹ de solución de hidróxido de sodio.
- Transferir a recipiente volumétrico de 25-mL.

- Equilibrar el recipiente volumétrico y el agua a 20 °C.
- Llenar con agua (20 °C) hasta la marca de calibración del recipiente volumétrico.

Estabilidad a 2-8 °C: 2 semanas.

Procedimiento de medición

Equilibrar sólo un volumen adecuado ($\approx 0,6$ mL por medición) de la solución del reactivo iniciador a 37 °C inmediatamente después del procedimiento de medición. El volumen restante de la solución del reactivo iniciador debe guardarse a 2-8 °C. Pipetear los volúmenes listados en la Tabla V uno tras otro dentro de la cubeta. Se deberán utilizar un espectrómetro de alto rendimiento y elementos volumétricos de alta precisión. La imprecisión de las mediciones fotométricas cinéticas y la imprecisión de la fracción de volumen de las muestras se determinarán por medio de procedimientos de pruebas con incertidumbres estándares conocidas.

BLANCO DE REACTIVO

Para determinar el blanco del reactivo, la muestra se reemplaza por una solución de cloruro de sodio 9 g.L⁻¹ (154 mmol.L⁻¹). El procedimiento de medición luego se lleva a cabo tal como se describe más arriba. La absorbancia inicial no deberá exceder 0,35 y el cambio en la absorbancia del blanco de reactivo deberá ser menor que $3,3 \times 10^{-5}$ s⁻¹ (0,002 min⁻¹). De lo contrario, las fuentes de contaminación por amilasa salivar deberán identificarse y excluirse o se deberá reevaluar la pureza de los reactivos.

BLANCO DE MUESTRA

Para la determinación del blanco de muestra, la solución del reactivo iniciador se reemplaza por una solución de 9 g.L⁻¹ (154 mmol.L⁻¹) de cloruro de sodio. El procedimiento de medición luego se lleva a cabo tal como se describe más arriba.

Nota: El blanco de muestra se determina y documenta pero no se lo tiene en cuenta para el cálculo de la concentración catalítica de α -amilasa en suero control y calibradores. Si el valor del blanco de muestra excede en 1% a la α -amilasa total, se debe advertir que el material no es apropiado para la calibración.

Nota: El blanco de reactivo para la muestra se determina reemplazando la solución del reactivo iniciador y la muestra por una solución de cloruro de sodio 9 g.L⁻¹.

Nota: La omisión del reactivo iniciador significa que se omite la sustancia que forma el indicador. Por lo tanto, no se identifica la interferencia de la matriz de la muestra en la reacción del indicador.

LÍMITE SUPERIOR DEL RANGO DE MEDICIÓN

Si el cambio en la absorbancia excede 0,0039 s⁻¹ (0,235 min⁻¹) en el intervalo de medición, se debe diluir una porción analítica de la muestra con una solución acuosa de cloruro de sodio 9 g.L⁻¹ (154 mmol.L⁻¹) y el procedimiento de medición debe repetirse con la muestra diluida. El valor obtenido luego debe multiplicarse por el factor de dilución correspondiente.

FUENTES DE ERROR

La concentración catalítica de α -glucosidasa en la mezcla de reacción completa final está inhibida de manera diferente por la matriz específica diluida del espécimen identificado (ver los comentarios correspondientes en el Apéndice 3). Por lo tanto, es necesario determinar la inhibición de α -glucosidasa dependiente de la matriz de para cada material investigado (Ver Apéndice 1).

Los agentes que complejan el calcio reducen la concentración disponible de este componente esencial y pueden originar valores de medición reducidos. La contaminación con amilasa salivar (por ejemplo, por contacto del dedo con las soluciones o de los bordes internos de los recipientes con la solución) da lugar a concentraciones catalíticas de α -amilasa falsamente concentradas o blancos de reactivo incrementados.

Cálculo

El cambio temporal en la absorbancia (s⁻¹) se calcula utilizando análisis de regresión (método de mínimos cuadrados). Luego de la sustracción del blanco del reactivo (s⁻¹), el cambio de absorbancia corregida (s⁻¹) se multiplica por el factor

$$F=3063$$

[medición a 405 nm, $405(4\text{-NP})=1012 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$]

Nota: La IFCC y la IRMM recomiendan el uso del coeficiente de absorción molar $\epsilon_{405}(4\text{-NP})=1012 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ (10).

La concentración catalítica de α -amilasa se calcula en $\mu\text{kat.L}^{-1}$.

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} \quad \begin{array}{l} \text{Cambio en la absorbancia (s}^{-1}\text{)} \\ \text{Amilasa luego de la corrección por el blanco} \\ \text{del reactivo (s}^{-1}\text{).} \end{array}$$

$$b_{\text{Amilasa}} \quad \begin{array}{l} \text{Concentración catalítica de } \alpha\text{-amilasa} \\ (\mu\text{kat.L}^{-1}) \end{array}$$

$$b_{\text{Amilasa}} = 3063 \quad \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad \begin{array}{l} \text{Amilasa} \\ \text{Amilasa} \end{array}$$

La concentración catalítica en $\mu\text{kat.L}^{-1}$ se puede convertir a U.L^{-1} multiplicando por el factor $f=60$.

Límites de referencia preliminares altos y bajos

VALORES DE REFERENCIA

Los intervalos de referencia preliminares se obtuvieron en dos laboratorios de referencia diferentes midiendo la actividad de α -amilasa en muestras de suero de dos cohortes de referencia (146 varones y 89 mujeres). Las cohortes de referencia comprendían muestras de sueros de empleados que se realizaban un chequeo anual de salud (primera cohorte) y de donantes de sangre (segunda cohorte). Las muestras se excluían de la cohorte de referencia si la concentración en al menos una de las siguientes determinaciones en suero excedían el límite de referencia superior: creatinina, glucosa, AST, ALT, GGT (y/o ALP) y lipasa (cohorte 2 solamente). No se pudieron observar diferencias significativas (prueba t, $p < 0,05$) entre las dos cohortes de referencia o entre las muestras de varones y de mujeres.

Los límites de referencia preliminares para hombres y para mujeres (≥ 17 años) son:

Límite de referencia inferior* (intervalo de confianza del 90% para el percentil 2,5)

$0,52 \mu\text{kat.L}^{-1}$ ($0,42 \mu\text{kat.L}^{-1}$ – $0,60 \mu\text{kat.L}^{-1}$)
 31 U.L^{-1} (25 U.L^{-1} – 36 U.L^{-1})

Límite de referencia superior * (intervalo de confianza del 90% para el percentil 97,5)

$1,78 \mu\text{kat.L}^{-1}$ ($1,71 \mu\text{kat.L}^{-1}$ – $2,00 \mu\text{kat.L}^{-1}$)
 107 U.L^{-1} (103 U.L^{-1} – 120 U.L^{-1})

* Los límites de referencia inferiores y superiores son los percentiles 2,5 y 97,5 de las cohortes de referencia. Los valores entre paréntesis son los intervalos de confianza del 90% para los percentiles 2,5 y 97,5.

Apéndice 1: Determinación de la concentración catalítica de α -glucosidasa bajo condiciones de reacción del procedimiento para α -amilasa.

REACTIVOS ADICIONALES

4-Nitrofenil- α -D-glucopiranósido ($\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_8$)
PM= 301,26

SOLUCIÓN A

$1,24 \text{ g}$ ($52,08 \text{ mmol.L}^{-1}$) de ácido N-2-Hidroxietil-piperazina-N'-etansulfónico
 $0,419 \text{ g}$ ($71,63 \text{ mmol.L}^{-1}$) de NaCl.
• Disolver en aproximadamente 80 mL de agua.

- Agregar $0,25 \text{ mL}$ de solución 1 para el procedimiento para α -amilasa (solución de reserva de cloruro de calcio).
- Ajustar pH (37°C) a 7,00 con solución de hidróxido de sodio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$.
- Transferir a un recipiente volumétrico de 100-mL .
- Equilibrar el recipiente volumétrico y el agua a 20°C .
- Llenar con agua (20°C) hasta la marca de calibración del recipiente volumétrico.

Estabilidad a 2 – 8°C : 5 semanas.

SOLUCIÓN B

$0,900 \text{ g}$ ($154,0 \text{ mmol.L}^{-1}$) de cloruro de sodio.

- Disolver en aproximadamente 80 mL de agua.
- Transferir a un recipiente volumétrico de 100-mL .
- Equilibrar el recipiente volumétrico y el agua a 20°C .
- Llenar con agua (20°C) hasta la marca de calibración del recipiente volumétrico.

Estabilidad a 20°C : 3 meses.

SOLUCIÓN DE REACCIÓN PARA α -GLUCOSIDASA

$0,0392 \text{ g}$ ($5,208 \text{ mmol.L}^{-1}$) de 4-nitrofenil- α -D-glucopiranósido

- Transferir a un recipiente volumétrico de 25-mL y disolver en aproximadamente 20 mL de solución A.
- Equilibrar el recipiente volumétrico y la solución A a 20°C .
- Llenar con solución A (20°C) hasta la marca de calibración del recipiente volumétrico.

Estabilidad a 2 – 8°C : 5 días.

Tabla VI. Concentraciones en la mezcla de reacción completa final para la medición de α -glucosidasa.

Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-etanesulfónico -	50 mmol.L^{-1}
pH (37°C)	$7,00 \pm 0,03$
4-Nitrofenil- α -D-glucopiranósido	5 mmol.L^{-1}
Cloruro de sodio	70 mol.L^{-1}
Cloruro de calcio	1 mmol.L^{-1}
Fracción de volumen de la muestra	$0,0320$ (1:31.25)

Tabla VII. Condiciones para la medición de α -glucosidasa.

Temperatura	$37,0^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$
Longitud de onda	$405 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$
Amplitud de banda	$\leq 2 \text{ nm}$
Camino óptico	$10,00 \text{ mm} \pm 0,01 \text{ mm}$
Tiempo de incubación	60 s
Tiempo de retraso	180 s
Intervalo de medición	180 s
Lecturas (puntos de medición)	≥ 6

Tabla VIII. Sistema analítico para la medición de α -glucosidasa.

2,40 mL	Solución de reacción para α -glucosidasa Equilibrar a 37 °C
0,08 mL	Solución B Mezclar completamente y esperar 60 s
0,02 mL	Solución de α -glucosidasa diluida con el Reactivo Diluyente para Enzimas Mezclar completamente, esperar 180 s y monitorear el tiempo y la absorbancia durante 180 s adicionales.

Nota: Aquí la solución B reemplaza a la muestra en el sistema de medición de la α -amilasa.

Condiciones de medición

Las concentraciones en la mezcla de reacción y las condiciones de medición se listan en las Tablas VI y VII.

PREPARACIÓN DE α -GLUCOSIDASA

1. Pesar aproximadamente 10 mg de la enzima liofilizada (registrar la masa pesada; m) y reconstituir con 1000 μ L de Reactivo Diluyente para Enzimas del procedimiento de α -amilasa.
2. Diluir 50 μ L de la α -glucosidasa reconstituida con 1000 μ L del Reactivo Diluyente para Enzimas. La dilución del primer paso es 1:21.
3. Diluir 50 μ L de la solución del paso 1 con 1000 μ L del Reactivo Diluyente para Enzimas. La dilución del segundo paso es 1:21. La dilución total luego del paso 1 y el paso 2 es 1:441. El factor de dilución es por lo tanto 441.

Nota: Las diluciones indicadas en el paso 1 y en el paso 2 son apropiadas para α -glucosidasa liofilizada que contiene 0,40–1,65 μ kat. mg^{-1} (25–100 U. mg^{-1}). La preparación de la α -glucosidasa liofilizada probablemente necesite otras diluciones. El factor de dilución debe cambiarse de acuerdo a la dilución.

Procedimiento de medición

La concentración catalítica de α -glucosidasa se determina bajo condiciones de reacción que se encuentran muy cerca de aquellas del procedimiento para α -amilasa.

La reacción comienza con la solución diluida de α -glucosidasa.

Pipetear los volúmenes indicados en la Tabla VIII secuencialmente dentro de la cubeta.

BLANCO DE REACTIVO

Para poder determinar el blanco del reactivo, la solución diluida de α -glucosidasa se reemplaza por el Reactivo Diluyente para Enzimas. El procedimiento de medición se lleva a cabo tal como se describe más arriba.

Cálculo

El cambio temporal en la absorbancia (s^{-1}) se calcula usando análisis de regresión (método de los mínimos cuadrados). Se sustrae el blanco de reactivo. El cambio de la absorbancia corregido se usa para calcular la concentración de la masa catalítica:

Cálculo de la concentración de masa catalítica de polvo liofilizado de α -glucosidasa:

$$b_{lio} = \frac{F_{dilución} 12350 \frac{\Delta A}{\Delta t}}{1000 m}$$

Nota: Esta fórmula es válida solamente si el volumen para la reconstitución es 1000 μ L (ver paso 1 en la sección Preparación de α -glucosidasa).

12350 Factor de cálculo [medición a 405 nm, $\epsilon_{405}(4\text{-NP}) = 1012 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$]

$\frac{\Delta A}{\Delta t}$ Cambio en la absorbancia luego de la corrección del blanco de reactivo (s^{-1}).

$F_{dilución}$ Factor de dilución (441 para el ejemplo anterior)

m Masa pesada (mg) de la α -glucosidasa reconstituida

b_{lio} Concentración de masa catalítica [$\mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$] de α -glucosidasa en el material liofilizado.

La concentración de masa catalítica en $\mu\text{kat} \cdot \text{mg}^{-1}$ se puede convertir a U. mg^{-1} multiplicando por el factor f=60.

Se usa también el mismo procedimiento para determinar la inhibición relativa de α -glucosidasa originada por la matriz de algunas muestras de α -amilasa. Se realizan dos mediciones: una, utilizando la Solución B y la otra sustituyendo la Solución B por la muestra de α -amilasa que se está investigando. En ambas mediciones, la reacción comienza con una solución de α -glucosidasa diluida con el Reactivo Diluyente para Enzimas a una concentración catalítica entre 8 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ y 33 $\mu\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ (500 μL y 2000 U. L^{-1}).

Tabla IX. Comparación de los métodos de la IFCC para la medición a 30 °C y 37 °C.

Procedimiento de referencia 37 °C	Método de referencia 30 °C	Comentario
<i>Espécimen investigado</i> Materiales de calibración, especímenes de control y suero humano	Suero humano	El procedimiento de referencia se usa primariamente para la medición de las muestras de control y los materiales de calibración
<i>pH de la mezcla de reacción final</i> el pH óptimo es 7,00	el pH óptimo es 7,10	El pH óptimo depende de la temperatura de medición
<i>pH de la solución 2</i> No existe diferencia con el pH de la mezcla de reacción	La diferencia con el pH de la mezcla de reacción es 0,02 unidades	Adicionarle EPS a las mezclas finales de reacción reduce el pH en el procedimiento a 30 °C.
<i>Tolerancia para el ajuste del pH</i> pH ± 0,03	No especificado	
<i>Tolerancia para el ajuste de temperatura</i> Incertidumbre ≤0,1 °C (k=2)	Sesgo menor que ± 0,05 °C, imprecisión menor que ± 0,1 °C	Un espectrofotómetro de alta calidad con dispositivos para ajuste y control de la temperatura debe dar una incertidumbre de temperatura (k=2) ≤ 0,1 °C.
<i>Tiempo de incubación</i> 60 s	Al menos 300 s	No se necesita un largo periodo de incubación de 300 s si la solución <i>buffer</i> y la muestra se calientan previamente a 37 °C. El contacto entre la muestra y el <i>buffer</i> no tiene que ser innecesariamente largo
<i>Tiempo de medición</i> 180 s	Al menos 300 s	Señales más altas a 37 °C permiten un tiempo de medición más corto sin aumentar la imprecisión
<i>Concentración catalítica de α-glucosidasa</i> 8100 U.L ⁻¹	4800 U.L ⁻¹	La misma cantidad de α-glucosidasa para 30 °C y 37 °C. La temperatura mayor induce un aumento en la actividad enzimática
<i>Preparación de la solución del reactivo iniciador</i> A la solución del reactivo iniciador se agrega HEPES. El pH tiene que ajustarse a 7,00. El pH de la solución 2 también se ajusta a 7,00.	La solución del reactivo iniciador se prepara con la solución 2 (pH 7,12) como solvente. El pH de la mezcla de reacción final es 7,10 debido a la acidez del EPS.	La acidez del EPS parece diferir de lote a lote. Por lo tanto, el pH de la solución 2 y el de la solución del reactivo iniciador tiene que ajustarse de manera separada.
<i>Determinación de la inhibición de α-glucosidasa por la matriz de la muestra</i> Se describe la determinación de la disminución relativa de la concentración catalítica de la α-glucosidasa originada por la matriz de la muestra y se define la inhibición máxima permitida.	No aborda el problema de inhibición de α-glucosidasa por la matriz de la muestra	Se observaron disminuciones relativas de 0-60% de las concentraciones catalíticas de α-glucosidasa (investigación de Schumann y Klauke de 17 materiales para control y calibradores y de 11 sueros humanos)

Tabla IX. *Continuación*

Procedimiento de referencia 37 °C	Método de referencia 30 °C	Comentario
Control de la fracción de masa de G7-4-NP en EPS La contaminación de EPS por G7-4-NP se limita a 0,1%. En el procedimiento de referencia se incluye un procedimiento para controlar el cumplimiento de esta especificación	No aborda el problema de la contaminación del sustrato por G7-4-NP	El G7-4-NP origina una fase prolongada de retraso que puede ser más larga que el tiempo de retraso. En estos casos se influye en la determinación de la concentración catalítica de α -amilasa. Por lo tanto, la contaminación está limitada a 0,1% en la especificación de EPS.
Unidad de concentración enzimática catalítica $\mu\text{kat.L}^{-1}$ y U.L^{-1}	$\mu\text{kat.L}^{-1}$	U.L^{-1} es la unidad común en bioquímica clínica, pero $\mu\text{kat.L}^{-1}$ se basa en el sistema SI
Diluyente para la enzima reactiva y preparación de la solución reactiva La albúmina de suero bovino y el cloruro de sodio en agua se usan para la preparación de la solución de reserva de α -glucosidasa, que se almacena a -25°C hasta su uso. La solución de reacción se prepara pipeteando 0,25 mL de la solución de α -glucosidasa en 25 mL de solución 2	La α -glucosidasa liofilizada se usa para la preparación de la solución de reacción. La masa equivalente a 600 U necesarias para 100 mL de la solución de reacción se pesa en una microbalanza	El procedimiento para 37 °C parece ser más simple. La preparación de los volúmenes menores a 100 mL de la solución de reacción es posible sin pérdida de la precisión del contenido enzimático. La solución de α -glucosidasa es estable durante un largo período (6 meses a -25 °C)
Blanco de la muestra. No se toma en cuenta	Sustracción	Usualmente, los blancos de la muestra no son sustraídas en los procedimientos de rutina. Por lo tanto, los valores asignados para los calibradores y los materiales de control son útiles solamente para los métodos de rutina si incluyen el blanco de la muestra
Temperatura de la solución del reactivo iniciador antes de su uso La solución del reactivo iniciador debe alcanzar una temperatura de 37 °C antes de su uso	No hay información acerca de la temperatura	El uso de la solución del reactivo iniciador a temperatura ambiente disminuye la temperatura de la cubeta
Recolección de datos Número de lecturas ≥ 6 de puntos de medición	No hay información acerca del número	Al menos 6 lecturas deben garantizar suficiente precisión de los resultados de medición.
Determinación de la pendiente (<i>tiempo vs. absorbancia</i>) Análisis de regresión que usa el método de los cuadrados mínimos	No hay información	Es necesario un método estadístico bien definido para asegurar la reproducibilidad del cálculo de la pendiente
Rango de referencia Mujeres y hombres $0,52-1,78 \mu\text{kat.L}^{-1}$ ($31-107 \text{U.L}^{-1}$)	Mujeres $0,41-1,08 \mu\text{Kat.L}^{-1}$ $24,4-64,8 \text{U.L}^{-1}$ Hombres $0,42-1,10 \mu\text{kat.L}^{-1}$ $(25,2-66,0 \text{U.L}^{-1})$	Los valores de referencia para mujeres y hombres se investigaron de manera separada para la temperatura de medición de 37 °C
Coeficiente de absorción molar de nitrofenóxido en la mezcla de reacción El coeficiente de absorción molar se determinó como $\epsilon 405(4-\text{NP})= 1012 \text{ m}^2.\text{mol}^{-1}$ ϵ es independiente del contenido de proteína de la muestra	$\epsilon 405(4-\text{NP})= 1056,8 \text{ m}^2.\text{mol}^{-1}$ en la solución de reacción a 30 °C $\epsilon 405(4-\text{NP})= 975 \text{ m}^2.\text{mol}^{-1}$ si se agregan a la mezcla de reacción muestras con concentración de proteínas entre 65 y 77 g.L^{-1}	La diferencia se puede explicar en parte por el diferente pH de las mezclas de reacción a 30 °C y 37 °C. La razón de la influencia de las proteínas a 30 °C no se pudo explicar. El uso de $\epsilon 405 (4-\text{NP})= 1012 \text{ m}^2.\text{mol}^{-1}$ es recomendado por IRMM/IFCC

Cálculo de la inhibición de α -glucosidasa dependiente de la matriz

La inhibición relativa (%) de la concentración catalítica de α -glucosidasa causada por la matriz de la muestra en la mezcla de reacción final se calcula a partir de las tasas de conversión obtenidas con y sin la muestra investigada.

$$Inh = 100 \left[1 - \frac{\frac{\Delta A}{\Delta t} \text{ muestra}}{\frac{\Delta A}{\Delta t} \text{ Sol B}} \right]$$

$\frac{\Delta A}{\Delta t} \text{ muestra}$	Cambio en la absorbancia en presencia de la muestra investigada en lugar de la Solución B (s^{-1})
$\frac{\Delta A}{\Delta t} \text{ Sol B}$	Cambio en la absorbancia usando la Solución B (s^{-1})
<i>Inh</i>	Inhibición relativa (%) de la concentración catalítica de α -glucosidasa causada por la matriz de la muestra en la mezcla de reacción final.

Nota: Si la inhibición relativa de la concentración catalítica de α -glucosidasa por la muestra en la prueba excede 45%, la fase de retraso probablemente no sea completa. Tal material no debería recomendarse como calibrador o como material de control.

Apéndice 2: Control de la fracción de masa de G7-4-NP en EPS

La solución 3 del procedimiento de referencia para α -amilasa se diluye 1+4 con el Reactivo Diluyente para Enzimas. Esta solución se mezcla con la solución del reactivo iniciador 1+100. Otra solución del reactivo iniciador se mezcla en la misma proporción con el Reactivo Diluyente para las Enzimas. Ambas mezclas se incuban a temperatura ambiente y se las protege de la luz durante 1 hora. La absorbancia a 405 nm de la solución del reactivo iniciador que contiene α -glucosidasa se mide a 37 °C. Como referencia se usa la solución del reactivo iniciador sin α -glucosidasa.

La contaminación de EPS por G7-4-NP es $\leq 0,1\%$ si la absorbancia medida es ≤ 32 .

Nota: El valor de la absorbancia de 0,32 se basa en EPS con un contenido del 100%. Se deben realizar correcciones si el lote de EPS que se utiliza tiene un contenido $<100\%$.

Apéndice 3: Cambios en el procedimiento de referencia de la IFCC para mediciones a 37 °C comparados con el método de referencia para mediciones a 30 °C tal como se describe en el documento original de la IFCC

El procedimiento de referencia primario se deriva del método de referencia de la IFCC (8) que proporciona condiciones optimizadas para la medición de la actividad catalítica de las concentraciones de α -amilasa. La temperatura de medición de 37 °C en lugar de 30 °C requiere solamente mínimos cambios en ciertos parámetros de medición para preservar las condiciones de medición óptimas. Las modificaciones se listan y comentan en la Tabla IX. Además, en la misma tabla se describe también si es necesario realizar una especificación más precisa en comparación con el método de referencia a 30 °C para mejorar el alto nivel de estandarización de las mediciones.

CORRESPONDENCIA

PROF. GERHARD SCHUMANN, KLINISCHE CHEMIE,
Medizinische Hochschule Hannover,
Carl-Neuberg-Str. 1, 30623 HANNOVER, Germany
Teléfono: +49-511-5322523, Fax: +49-511-5325671,
E-mail: schumann.gerhard@mh-hannover.de

Referencias bibliográficas

1. Siekmann L, Bonora R, Burtis CA, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Férand G, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 1. The concept of reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes. Clin Chem Lab Med 2002; 40: 631-4.
2. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Férand G, Ferrero CA, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 2. Reference procedure for the measurement of catalytic activity concentration of creatine kinase [ATP: creatine N-phosphotransferase (CK), EC 2.7.3.2]. Clin Chem Lab Med 2002; 40: 635-42.
3. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Férand G, Ferrero CA, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 3. Reference procedure for the measurement of catalytic activity concentration of lactate dehydrogenase [L-lactate: NAD⁺ oxidoreductase (LDH), EC 1.1.1.27]. Clin Chem Lab Med 2002; 40: 636-48.

4. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Férand G, Ferrero CA, Franck PF, *et al.* IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic activity concentration of alanine aminotransferase [L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase (ALT), EC 2.6.1.2]. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 718–24.
5. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Férand G, Ferrero CA, Franck PF, *et al.* IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic activity concentration of aspartate- aminotransferase [L aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase (AST), EC 2.6.1.1]. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 725–33.
6. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Férand G, Ferrero CA, Franck PF, *et al.* IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic activity concentration of γ -glutamyltransferase [(γ -glutamyl)-peptide: amino acid γ -glutamyltransferase (GGT), EC 2.3.2.2]. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 734–8.
7. Siekmann L, Bonora R, Burtis CA, Ceriotti F, Clerc- Renaud P, Férand G, *et al.* IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 7. Certification of four reference materials for the determination of enzymatic activity of γ -glutamyltransferase, lactate dehydrogenase, alanine aminotransferase and creatine kinase according to IFCC procedures at 37 °C. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 739–45.
8. 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.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and testing of reagent water in the clinical laboratory; Proposed guideline, 4th ed.
10. 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. EUR 19927 EN. IRMM/IFCC, 2001.