

**Società Italiana di Biochimica Clinica e
Biologia Molecolare Clinica (SIBioC)
Divisione Scientifica - Gruppo di Studio "Enzimi"***

Raccomandazione per l'impiego routinario della determinazione dell'isoenzima pancreatico dell'amilasi in sostituzione dell'amilasi totale nella diagnosi e nel monitoraggio della patologia pancreatica**

**Mauro Panteghini¹, Ferruccio Ceriotti², Carlo Franzini³, Franca Pagani¹, Sandra Secchiero⁴,
Martina Zaninotto⁵ per il Gruppo di Studio 'Enzimi' della Società Italiana di Biochimica Clinica
e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC)**

¹ Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili', Brescia

² Laboratorio Centrale, Ospedale San Raffaele, Milano

³ Università degli Studi di Milano, Istituto di Scienze Biomediche, Ospedale L. Sacco

⁴ Centro di Ricerca Biomedica, Castelfranco Veneto TV

⁵ Laboratorio Centrale, Azienda Ospedaliera di Padova

INTRODUZIONE

L' α -amilasi (1,4- α -D-glucan glucanoidrolasi; EC 3.2.1.1; AMY) è un enzima che viene principalmente prodotto e immagazzinato nelle ghiandole salivari e nel pancreas, sotto forma di due distinti isoenzimi, comunemente contrassegnati come S e P, dalle iniziali dei principali organi produttori (1). L'AMY viene principalmente secreta nel tratto digestivo, ma passa in quantità limitate anche nel sangue ed è escreta nelle urine. Normalmente le sue concentrazioni ematiche sono basse e relativamente costanti, aumentando notevolmente durante alcune malattie quali la pancreatite acuta o processi infiammatori a carico delle ghiandole salivari. E' evidente quindi che, sebbene la determinazione dell'AMY possa risultare di interesse clinico in quanto l'enzima aumenta sia nel siero che nelle urine in corso di patologia pancreatica acuta, si tratta di un esame poco specifico per tale condizione clinica perchè valori aumentati di AMY si riscontrano anche in caso di patologie extrapancreatiche (parotite, patologie gastrointestinali, danno renale, ecc.).

Si può pertanto ben comprendere l'elevato interesse clinico da sempre attribuito alla determinazione diretta dell'isoenzima pancreatico (P-AMY) e al suo possibile utilizzo in

* Membri del Gruppo di Studio sono: M. Panteghini (Brescia) - Coordinatore, F. Ceriotti (Milano), C. Franzini (Milano), L. Lazzaroni (Monza), A. Mosca (Milano), L. Prencipe (Milano), S. Secchiero (Castelfranco Veneto), M. Zaninotto (Padova).

**Questo e' un documento provvisorio che viene pubblicato per essere portato alla conoscenza di tutti i Soci in attesa di commenti ed osservazioni. Tutti i suggerimenti vanno inviati entro 6 mesi dalla data di pubblicazione a: Dr. Mauro Panteghini, Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1, Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili', 25123 Brescia (fax 030-3995369; e-mail: panteghi@bshosp.osp.unibs.it). Essi saranno attentamente vagliati, discussi ed eventualmente introdotti nella versione finale della Raccomandazione

sostituzione della determinazione dell'attività enzimatica totale nella diagnosi differenziale del cosiddetto 'addome acuto' (2). Dal momento della scoperta dell'eterogeneità dell'AMY, sono stati in effetti messi a punto numerosi metodi per la determinazione selettiva della P-AMY, ma solo con la definitiva disponibilità dei metodi basati sull'inibizione isoenzimatica selettiva, ottenuta con specifici anticorpi monoclonali, si sono tuttavia ottenute caratteristiche di precisione, affidabilità, semplicità e velocità analitiche tali da consentire una reale stima del valore di efficienza diagnostica della determinazione della P-AMY nella diagnosi di pancreatite (1).

Questo documento passa in rassegna, a più di dieci anni dall'introduzione commerciale dei metodi immunochimici per la determinazione della P-AMY, i motivi, e le corrispondenti evidenze scientifiche, che devono oggi indurre il Laboratorio, nel caso di sospetto di patologia pancreatica, alla completa sostituzione della determinazione dell'AMY totale con quella della P-AMY.

ASPETTI ANALITICI

Nella seconda metà degli anni '80, l'introduzione dell'impiego degli anticorpi monoclonali nelle procedure analitiche ha praticamente rivoluzionato l'orizzonte relativo all'impiego clinico della determinazione degli isoenzimi dell'AMY (3-7). La pietra miliare del progresso analitico in questo campo può essere considerata la produzione di un particolare anticorpo monoclonale capace non solo di riconoscere ma anche di inibire specificamente l'isoenzima salivare (S-AMY) (8). Ciò ha consentito non solo di pensare i test immunochimici nelle tradizionali forme di immunoprecipitazione o di determinazione immunoenzimatica, laddove l'anticorpo è solo legante l'isoenzima, ma di confezionare un test di immunoinibizione in fase omogenea che potesse essere quindi applicabile a qualsivoglia analizzatore automatico di Chimica Clinica. L'ulteriore scoperta di un'azione sinergica nell'inibizione di S-AMY tra questo anticorpo ed un altro monoclonale anti-S-AMY permise di ottenere un test che, pur possedendo una specificità praticamente assoluta per l'isoenzima P-AMY, aveva le stesse caratteristiche di una procedura per la determinazione dell'attività totale dell'enzima (9,10). Oggetto di alcune importanti valutazioni preliminari, che ne hanno inizialmente descritto le principali caratteristiche analitiche (facilità di esecuzione anche in condizioni di emergenza, possibilità di completa automazione, elevata specificità per l'isoenzima pancreatico) (11-13), il metodo è successivamente entrato, nel corso degli anni '90, nell'impiego routinario di numerosi laboratori, confermando all'atto pratico la sua elevata affidabilità. La Figura I mostra, come esempio, i risultati del monitoraggio dell'imprecisione analitica di tale metodo, relativi al Controllo di Qualità Interno, anni 1991-2000, del Laboratorio di uno degli autori. Considerando gli

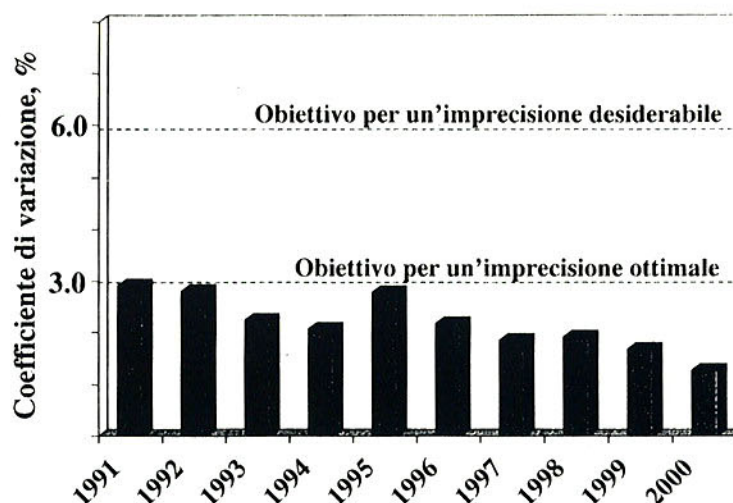


Figura I

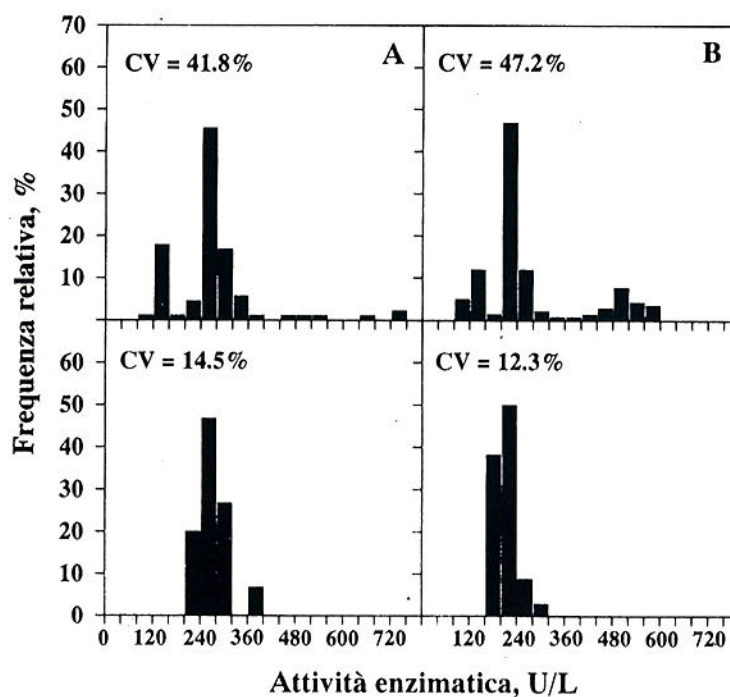
Risultati del monitoraggio dell'imprecisione analitica della determinazione dell'amilasi pancreatica con metodo immunochimico, relativi al Controllo di Qualità Interno, anni 1991-2000, del Laboratorio Analisi Chimico Cliniche 1 dell'Azienda Ospedaliera 'Spedali Civili' di Brescia.

obiettivi di imprecisione analitica ricavati dai dati della variabilità biologica della P-AMY (imprecisione desiderabile: CV <5.9%; imprecisione ottimale: CV <3.0%) (14), si evidenzia chiaramente come il metodo abbia continuativamente fornito per un decennio risultati ben al di sotto del limite già considerato come ottimale per il suo utilizzo clinico. Non bisogna inoltre dimenticare l'esclusivo impiego in tali metodi di substrati cromogenici di struttura definita, che sono attualmente considerati i più affidabili per la misura dell'attività catalitica di questo enzima (15,16). Questa riduzione nella varietà dei substrati utilizzati e, di conseguenza, nel numero delle relative reazioni cromogeniche comporta inoltre un ulteriore significativo vantaggio rappresentato da una più facile trasferibilità dei risultati tra i diversi Laboratori che eseguono l'esame in differenti realtà ospedaliere [obiettivo principale della moderna Enzimologia Clinica (17)], eliminando, o per lo meno riducendo, i problemi di standardizzazione metodologica (e quindi di comparazione) che ancora esistono per la determinazione dell'attività dell'AMY totale, nel caso vengano usati metodi differenti (16). A supporto di ciò, stanno i dati che si possono estrapolare dalle Verifiche Esterne di Qualità che valutano sia l'AMY totale che la P-AMY e nelle quali è chiaramente evidenziabile una maggiore dispersione interlaboratori delle misure relative all'enzima totale in confronto a quella ottenuta per la determinazione dell'isoenzima pancreatico (Fig. II). Una diretta conseguenza di questa maggiore comparabilità metodologica è infine la possibilità di uniformare più facilmente gli intervalli di riferimento nel territorio nazionale e anche internazionalmente (18).

ASPETTI CLINICO-DIAGNOSTICI

Tipico del paziente con pancreatite acuta è l'aumento dell'attività della P-AMY nel siero. Alla sensibilità clinica costantemente elevata si associa una specificità che varia in funzione della popolazione studiata e quindi della casistica clinica considerata. Risultati falsamente positivi di P-AMY sono stati osservati in pazienti con insufficienza renale, nei quali l'escrezione dell'enzima è fortemente ridotta, ed in soggetti con macroamilasemia, dove il legame dell'immunoglobulina con l'AMY diminuisce o impedisce un'efficiente inibizione delle forme salivari da parte degli anticorpi monoclonali (19). Tuttavia, quando la determinazione della P-AMY è stata correttamente valutata in popolazioni con dolore addominale acuto e sospetto di pancreatite (più di 2200 soggetti studiati in letteratura)

Figura II
Risultati di due programmi di Verifica Esterna di Qualità (VEQ) nazionali relativi allo stesso campione determinato per l'amilasi totale (parte superiore della figura) e per l'amilasi pancreatico (parte inferiore della figura).
A = Programma VEQ Bio-Rad-PROLARIT;
B = Programma VEQ Centro di Ricerca Biomedica Castelfranco Veneto.
CV = coefficiente di variazione interlaboratori



applicando il livello decisionale ottimale (pari a 3 volte il limite superiore di riferimento), i risultati di specificità clinica per la diagnosi di pancreatite acuta sono stati sempre superiori al 90% (Tabella 1) (20-24). È importante inoltre notare che quando l'efficacia diagnostica della determinazione della P-AMY è stata direttamente confrontata negli stessi pazienti con quella dell'AMY totale, la prima è risultata significativamente migliore (23). Anche la sensibilità durante il decorso della malattia è marcatamente diversa; infatti, in seguito a pancreatite acuta, permangono nel siero valori elevati di P-AMY anche quando non si riscontra più un aumento dell'attività dell'AMY totale. In uno studio, mentre il 70% dei pazienti con pancreatite acuta non complicata mostrava dopo una settimana dall'esordio della malattia valori di AMY totale nella norma, solamente il 20% degli stessi pazienti mostrava allo stesso tempo un valore già normalizzato della P-AMY (19). Tra l'altro, questo prolungato aumento dell'isoenzima pancreatico nel siero rende anche inutile la tradizionale determinazione dell'attività amilasica totale nelle urine, eseguita principalmente con lo scopo di ottenere una maggior sensibilità diagnostica nella fase tardiva della pancreatite.

In aggiunta a quanto presente nella letteratura internazionale sull'elevata efficacia diagnostica della P-AMY, sembra anche importante riportare due esperienze pratiche di valutazione del significato clinico del dosaggio, compiute propedeuticamente alla sua introduzione nei Laboratori di due degli autori del presente documento. In entrambe è stato confrontato il comportamento del dosaggio dell'AMY totale e quello della P-AMY in casistiche discretamente ampie, routinariamente sottoposte alla valutazione della prima, al fine di evidenziare un'eventuale miglioramento dell'efficienza diagnostica nel caso di sostituzione di questa con la determinazione diretta dell'isoenzima. Nel corso della prima valutazione, erano analizzate 623 richieste da pazienti con problemi di varia natura, pancreatici e non (25). Dei 25 casi senza patologia pancreatica e aumento di AMY totale, solo 9 (36%) mostravano anche aumento della P-AMY, confermando la maggiore specificità diagnostica di quest'ultima, con la riduzione di circa 2/3 dei risultati falsi-positivi. Nella seconda esperienza erano analizzati circa 3500 campioni nel giro di due anni ai quali era stata routinariamente richiesta la determinazione dell'AMY totale (2, 26). 650 sieri mostravano aumento dell'AMY totale, ma di questi il 12% dovevano tale aumento ad un incremento della forma salivare, con P-AMY nella norma. La determinazione della P-AMY si dimostrava particolarmente utile per la diagnosi differenziale delle iperamilasemie di origine extrapancreatica (il cosiddetto quadro "salivare") nelle quali l'isoenzima pancreatico non è aumentato (26). È importante notare che entrambe le esperienze concludevano affermando che l'eventuale impiego di questo dosaggio al posto dell'AMY totale avrebbe potuto ridurre la necessità di ulteriori indagini di laboratorio e radiografiche in quei pazienti con iperamilasemia associata a condizioni aspecifiche, quali dolore addominale aspecifico, abuso acuto di alcool e patologie delle ghiandole salivari.

Un cenno a parte merita il caso di pazienti con insufficienza renale cronica nei quali sia anche sospettata una patologia pancreatica acuta. L'insufficienza renale, infatti, causa una diminuita clearance di tutte le proteine sieriche di piccole dimensioni, inclusa la P-AMY, con la conseguenza di un aumento di questo enzima nel siero di questi pazienti (27). Tuttavia, è stato chiaramente dimostrato che aumenti della P-AMY nel siero superiori a 5 volte il limite superiore di riferimento sono indice attendibile della presenza di una pancreatite acuta anche in questi soggetti (28).

Tabella 1
Sensibilità e specificità della determinazione dell'amilasi pancreatica con metodo immunochimico nella diagnosi di pancreatite acuta in soggetti con dolore addominale acuto

Autore	No. soggetti (prevalenza pancreatite acuta)	Livello decisionale (x LSR*)	Sensibilità %	Specificità %
Van Lente & Kazmierczak (20)	100 (37%)	3	89.0	91.0
Van Ingen & Sanders (21)	64 (47%)	3.1	93.0	97.0
Huguet et al. (22)	928 (14%)	1	96.0	88.0
Turcotte et al. (23)	1005 (5.5%)	1	85.5	92.5
Ignjatovic et al. (24)	131 (45%)	3.6	91.5	91.7

*LSR = limite superiore di riferimento

CONCLUSIONI

In un'epoca nella quale ormai ogni scelta e cambiamento devono necessariamente essere basati su robuste ed incontrovertibili evidenze, crediamo che ormai esistano numerose e consolidate ragioni per sostituire completamente l'impiego dell'AMY totale con la determinazione della P-AMY all'interno dell'elenco delle prestazioni fornite da un Laboratorio Diagnostico. In particolare, la determinazione della P-AMY mostra:

- Maggiore sensibilità e specificità per il danno tissutale pancreatico;
- Semplicità e tempi di esecuzione delle metodiche perfettamente adattabili a condizioni d'emergenza;
- Precisione analitica altamente soddisfacente per il suo utilizzo clinico;
- Possibilità di trasferire facilmente e comparare i risultati ottenuti in diverse realtà sanitarie;
- Livelli decisionali per l'impiego nella diagnosi di pancreatite acuta chiaramente definiti.

BIBLIOGRAFIA

1. Panteghini M, Pagani F. Isoenzimi dell'amilasi: laboratorio e clinica. *Biochim Clin* 2000;24:421-30.
2. Panteghini M. Pancreatic amylase: esoteric test or primary step in the evaluation of patients with abdominal pain? *Clin Chem Lab Med* 2000;38:A6.
3. Mifflin TE, Benjamin DC, Bruns DE. Rapid quantitative, specific measurement of pancreatic amylase in serum with use of a monoclonal antibody. *Clin Chem* 1985;31:1283-8.
4. Gerber M, Naujoks K, Lenz H, Gerhardt W, Wulff K. Specific immunoassay of α -amylase isoenzymes in human serum. *Clin Chem* 1985;31:1331-4.
5. Hiroishi S, Matsuyama S, Kurooka S, Sunahara N, et al. Differential assay of human salivary and pancreatic α -amylase using a monoclonal antibody insolubilized on bacterial cell wall. *Clin Chim Acta* 1986;159:89-91.
6. Rosenblum JL. Direct, rapid assay of pancreatic isoamylase activity by use of monoclonal antibodies with low affinity for macroamylasemic complexes. *Clin Chem* 1988;34:2463-8.
7. Svens E, Kapyaho K, Tanner P, Weber TH. Immunocatalytic assay of pancreatic alpha-amylase in serum and urine with a specific monoclonal antibody. *Clin Chem* 1989;35:662-4.
8. Gerber M, Naujoks K, Lenz H, Wulff K. A monoclonal antibody that specifically inhibits human salivary α -amylase. *Clin Chem* 1987;33:1158-62.
9. Rauscher E, Gerber M. Pancreatic α -amylase assay employing the synergism of two monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta* 1989;183:41-4.
10. Tietz NW, Burlina A, Gerhardt W, Junge W, et al. Multicenter evaluation of a specific pancreatic isoamylase assay based on a double monoclonal-antibody technique. *Clin Chem* 1988;34:2096-2102.
11. Zaninotto M, Bertorelle R, Secchiero S, Plebani M, Burlina A. Assay of pancreatic amylase with use of monoclonal antibodies evaluated. *Clin Chem* 1988;34:2552-5.
12. Hafkenschied JCM, Hessels M, Wetzels JFM. Comparison of two methods for the determination of the isoenzymes of α -amylase in serum and urine. *Scand J Clin Lab Invest* 1989;49:441-4.
13. Badenoch JL, Bais R. Methods compared for determining total amylase activity and amylase isoenzymes in serum. *Clin Chem* 1989;35:645-8.
14. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.
15. Lorentz K. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 9. IFCC method for α -amylase. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:185-203.
16. Ceriotti F. Amilasi: quale metodo di determinazione? *Biochim Clin* 1997;21:553-6.
17. Panteghini M, Ceriotti F on behalf of SIBioC Committee on Enzymes. Establishing a reference system in clinical enzymology. *Biochim Clin* 2000;24: 499-508.
18. Skude G. Pancreatic isoamylase as a routine test. *eJIFCC* 2000;12: <http://www.ifcc.org/-eJIFCC/vol12no1/amylase.html>
19. Panteghini M, Pagani F. Diagnostic value of measuring pancreatic isoamylase with a double-monoclonal antibody immunoassay in serum of hospitalized hyperamylasemic patients. *J Clin Lab Analysis* 1990;4:449-52.
20. Van Lente F, Kazmierczak SC. Immunologically-derived pancreatic amylase, pancreatic lipase, and total amylase compared as predictors of pancreatic inflammation. *Clin Chem* 1989;35:1542.

21. Van Ingen HE, Sanders GTB. Clinical evaluation of a pancreatic lipase mass concentration assay. *Clin Chem* 1992;38:2310-3.
22. Huguet J, Castineiras MJ, Fuentes-Arderiu X. Diagnostic accuracy evaluation using ROC curve analysis. *Scan J Clin Lab Invest* 1993;53:693-9.
23. Turcotte GE, Nadeau L, Forest JC, Douville P, et al. A new rapid immunoinhibition pancreatic amylase assay: diagnostic value for pancreatitis. *Clin Biochem* 1994;27:133-9.
24. Ignjatovic S, Majkic-Singh N, Mitrovic M, Gvozdenovic M, Todorovic M. Lipase, total and pancreatic amylases as markers of acute pancreatitis identified by ROC curve analysis. *Eur J Lab Med* 1997;5:145-7.
25. Franzini C, Morelli AM, Ottaviano R, Pagani A. Amilasi ed isoamilasi del siero in differenti patologie mediante tecnica di immunoinibizione con anticorpi monoclonali. *Giorn It Chim Clin* 1990;15:257-62.
26. Panteghini M. Diagnostic value of measuring serum pancreatic enzymes in hyperamylasemia. *Progr Med Lab* 1991;5:161-7.
27. Royse VL, Jensen DM, Corwin HL. Pancreatic enzymes in chronic renal failure. *Arch Intern Med* 1987;147:537-9.
28. Lin XZ, Chen TW, Wang SS, Shiesh SC, et al. Pancreatic enzymes in uremic patients with or without dialysis. *Clin Biochem* 1988;21:189-92.