

Isoenzimi dell'amilasi: laboratorio e clinica

Mauro Panteghini, Franca Pagani

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

Per conto della Commissione 'Enzimi' della Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC)

ABSTRACT

Amylase isoenzymes: clinical and laboratory

α -Amilase catalyses the hydrolysis of starch, glycogen, and related poly- and oligosaccharides. The end products formed are dextrins, maltose, and some glucose. In man, the enzyme is secreted by the salivary and pancreatic glands into the digestive tract, but small amounts are also present in blood and urine. The concentrations in biological fluids significantly increase during organ diseases, such as acute pancreatitis or salivary gland inflammation. The determination of amylase may therefore have clinical value, even if it is well known the lack of specificity of this assay for the diagnosis of acute pancreatitis. Consequently, the differential measurement of the amylase isoenzymes represents in many cases a clinical need. This review considers the state of the art of these determinations and their clinical utility, focusing mainly on pancreatic molecular form.

RIASSUNTO

L' α -amilasi è un enzima che idrolizza i legami interni α -1,4 glicosidici dell'amido e del glicogeno dando origine a poli- e oligosaccaridi e successivamente, procedendo nell'idrolisi, a prodotti finali quali destrine, maltosio e una piccola quantità di glucosio. Nell'uomo, l'enzima è prodotto e immagazzinato nelle ghiandole salivari e nel pancreas, viene principalmente secreto nel tratto digestivo, ma passa in quantità limitata anche nel sangue ed è escreto nelle urine. Normalmente le concentrazioni enzimatiche nel siero e nelle urine sono basse e relativamente costanti, aumentando notevolmente durante alcune malattie quali la pancreatite acuta o processi infiammatori a carico delle ghiandole salivari. Sebbene quindi la determinazione dell'amilasi risulti di indubbio interesse clinico, in quanto l'enzima aumenta in corso di patologia pancreatica acuta, esso è un test poco specifico perchè valori aumentati di tale enzima si riscontrano anche in caso di patologie extrapancreatiche (parotite, patologie gastrointestinali, danno renale, ecc.). E' quindi spesso necessario procedere ad un approfondimento diagnostico con indagini riguardanti la valutazione delle singole componenti isoenzimatiche. Questa rassegna analizza lo stato dell'arte di tali determinazioni e della loro utilità clinica (con particolare riguardo alla forma pancreatica), dopo aver considerato gli aspetti biochimici e fisiologici.

INTRODUZIONE

L' α -amilasi (1,4- α -D-glucan glucanoidrolasi; EC 3.2.1.1; AMY) è un enzima che idrolizza i legami interni α -1,4 glicosidici dell'amido e del glicogeno dando origine a poli- e oligosaccaridi e successivamente, procedendo nell'idrolisi, a prodotti finali quali destrine, maltosio e una piccola quantità di glucosio.

Nell'uomo, l'enzima è prodotto e immagazzinato nelle ghiandole salivari e nel pancreas, viene principalmente secreto nel tratto digestivo, ma passa in quantità limitata anche nel sangue ed è escreto nelle urine. Normalmente le concentrazioni enzimatiche nel siero e nelle urine sono basse e relativamente costanti, aumentando notevolmente durante alcune malattie quali la pancreatite acuta o

processi infiammatori a carico delle ghiandole salivari. Sebbene quindi la determinazione dell'AMY risulti di indubbio interesse clinico in quanto l'enzima aumenta sia nel siero che nelle urine in corso di patologia pancreatica acuta, esso è un esame poco specifico perchè valori aumentati di tale enzima si riscontrano anche in caso di patologie extrapancreatiche (parotite, patologie gastrointestinali, danno renale, ecc.). Per questo motivo, è spesso necessario procedere ad un approfondimento diagnostico con indagini riguardanti la valutazione delle singole componenti isoenzimatiche.

ORIGINE E STRUTTURA

La possibile esistenza di isoenzimi dell'AMY umana è

stata per la prima volta riportata da McGeachin e Lewis nel 1959. Due principali isoenzimi sono sintetizzati da due distinti geni strutturali denominati AMY-1 e AMY-2, strettamente correlati sul cromosoma 1 (1). Essi danno origine a due prodotti genetici primari, comunemente contrassegnati come S e P, dalle iniziali dei principali organi produttori, ghiandole salivari e pancreas. E' stata dimostrata un'identità di circa il 93% della sequenza aminoacidica dei due isoenzimi, mentre maggiori differenze strutturali risiedono nella presenza (S-AMY) o assenza (P-AMY) di carboidrati nelle molecole isoenzimatiche (2,3). Per il locus AMY-2, che codifica per l'isoenzima P-AMY, è noto un polimorfismo genetico che dà origine ad una variante isoenzimatica, facilmente evidenziabile con metodologie separative, presente in circa il 6% della popolazione. Inoltre, è stata riportata la possibile esistenza di una variante allelica di AMY-2, definita "silente", in quanto incapace di produrre l'isoenzima P-AMY (4). Anche del locus AMY-1 sono state segnalate varianti alleliche ma con frequenza molto più rara (<1% della popolazione).

Ciascuno dei due isoenzimi subisce una serie di modificazioni post-traduzionali che danno origine a varie isoforme. L'isoenzima S-AMY maturo è una glicoproteina formata da una singola catena polipeptidica, con un peso molecolare di circa 62.000 daltons. La presenza di carboidrati sulla molecola fa sì che l'enzima venga riconosciuto dai recettori per carboidrati presenti nel fegato, spiegandone la eliminazione più rapida dalla circolazione rispetto alle forme non-glicosilate P. Post-sinteticamente, S-AMY è sottoposta a modificazioni, quali deglicosilazione e deamidazione, che danno origine a fino a quattro isoforme, evidenziabili con procedure separative. Si può quindi schematicamente pensare a due gruppi di isoforme S, uno contenente carboidrati e uno no; all'interno di ciascun

gruppo, le varie isoforme differiscono per la successiva perdita di gruppi ammidici da residui di asparagina e glutammina, principalmente dovuta a cause nonenzimatiche ma anche all'azione di enzimi proteolitici ad attività deamidasi (Fig. 1) (5,6).

L'isoenzima P-AMY (peso molecolare 54.000 daltons) non contiene carboidrati, per cui l'unica modificazione in cui è coinvolto è la deamidazione con formazione di almeno un'isoforma a migrazione elettroforetica più anodica. Per l'isoenzima P-AMY la deamidazione sembra essere principalmente dovuta ad enzimi proteolitici presenti nella secrezione pancreatica. Un'esasperazione di tali processi di deamidazione si ha in clinica nel caso di formazione di pseudocisti pancreatiche, raccolte di tessuto, detriti cellulari, secrezione pancreatica e liquido ematico, che rappresentano una non rara complicanza della pancreatite acuta o di traumi pancreatici. In tali raccolte, la P-AMY proveniente dalle secrezioni pancreatiche rimane a contatto per un periodo di tempo prolungato con gli enzimi deaminanti presenti nelle secrezioni stesse, dando origine ad isoforme deaminate in quantità e numero superiori al normale, le quali possono essere rilevate anche nel siero dei pazienti stessi. Come sarà detto più avanti, tali fenomeni di deamidazione degli isoenzimi dell'AMY possono aver luogo in particolari condizioni anche "in vitro", col risultato, se il campione non viene conservato in maniera idonea, di possibili significative alterazioni del quadro isoenzimatico.

NOMENCLATURA

Seguendo le raccomandazioni degli organismi internazionali, i due isoenzimi AMY dovrebbero essere indicati come AMY1 (S-AMY) e AMY2 (P-AMY), distinguendo le

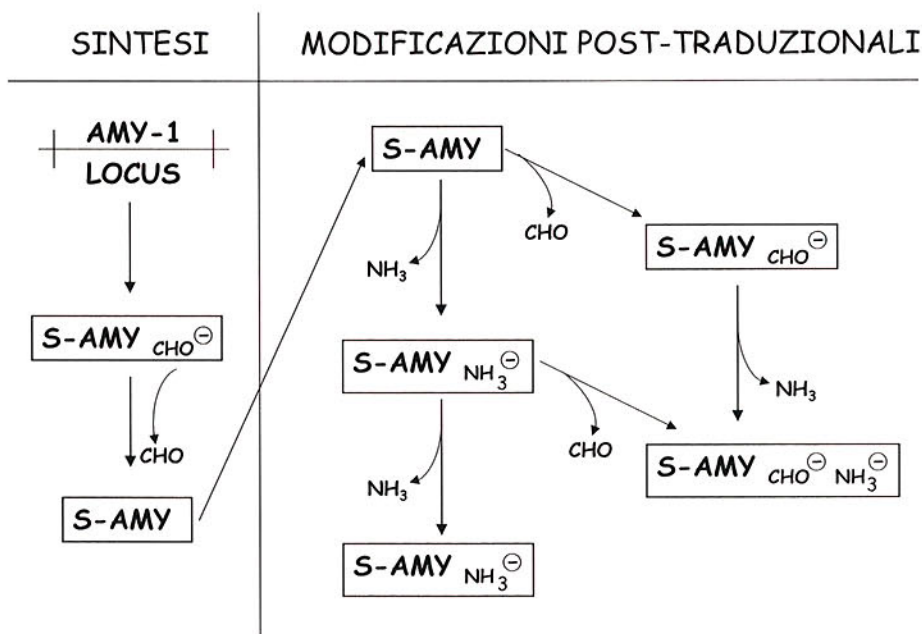


Figura 1
Origine dell'isoenzima S-AMY e delle sue isoforme. CHO⁻ indica deglicosilazione; NH₃⁻ indica deamidazione

varie isoforme, quando considerate separatamente, con lettere minuscole sottoscritte (AMY_{1a}, AMY_{1b}, AMY_{1c}, AMY_{1d} e AMY_{1e}, per le cinque isoforme S, dove AMY_{1e} è l'isoenzima AMY1; AMY_{2a} e AMY_{2b} per le due principali isoforme P, dove AMY_{2b} è l'isoenzima AMY2). La principale variante dell'isoenzima P-AMY dovrebbe essere identificata come AMY2-B dalla sigla del corrispondente fenotipo B, anche se nella maggior parte della letteratura viene contrassegnata con la sigla P1. Nel presente testo, verranno tuttavia usate le sigle S-AMY e P-AMY per identificare gli isoenzimi, al fine di non creare troppa confusione rispetto a quanto riportato in letteratura dove l'uso delle sigle precedenti è invalso da circa 20 anni. Per ulteriore chiarezza, necessita ricordare che spesso in passato le isoforme AMY sono state numerate sequenzialmente partendo non dalla forma a migrazione elettroforetica più anodica ma da quella a migrazione più catodica. Secondo questo schema numerico l'isoenzima S-AMY era contrassegnato come S1 e quello P-AMY come P2 (essendo P1 la variante più sopra ricordata), mentre le isoforme derivate acquisivano numeri sequenziali (es. S2, S3, P3, ecc.).

Si deve anche rammentare che secondo le raccomandazioni IFCC per la espressione dei risultati, le abbreviazioni S-AMY e P-AMY indicherebbero rispettivamente "amilasi del siero" e "amilasi del plasma". Queste modalità di espressione non sono tuttavia frequentemente utilizzate in Italia

LOCALIZZAZIONE TISSUTALE

Nell'organismo umano, l'AMY è presente in numerosi organi e tessuti (7). L'organo con più elevato contenuto di enzima sono le ghiandole salivari che contengono da due a cinque volte più enzima del pancreas. In quest'ultimo è presente esclusivamente l'isoenzima P-AMY, sintetizzato dalle cellule acinose e quindi secreto nel lume intestinale attraverso il sistema duttale pancreatico. Concentrazioni 50-100 volte inferiori di tale isoenzima sono state dimostrate nell'ileo, nel digiuno, nel duodeno, nel colon e, recentemente, anche nei dotti biliari intraepatici. L'AMY prodotta dalle ghiandole salivari è invece l'isoenzima S-AMY, che è riscontrabile in concentrazioni circa 1000 volte inferiori anche nelle tube di Fallopio, nella tiroide, nelle

ghiandole lacrimali e in quelle mammarie durante la lattazione. Altri organi che possiedono attività amilasica (polmone, stomaco, ovaio) contengono probabilmente entrambi gli isoenzimi S e P. E' evidente quindi che la specificità della localizzazione tissutale di entrambi gli isoenzimi non è assoluta. Ciò ha naturalmente importanti conseguenze diagnostiche. Sebbene, ad esempio, la P-AMY sia presente in maggiori concentrazioni nel pancreas, origini tissutali alternative, prima fra tutte l'intestino tenue, possono giocare un ruolo rilevante nel causare significativi aumenti di tale isoenzima nel sangue nel corso di particolari situazioni cliniche che coinvolgono tali organi (8).

FISIOLOGIA

Siero e urina contengono normalmente entrambi i gruppi di isoforme derivati dagli isoenzimi S e P, con una netta prevalenza degli isoenzimi veri (AMY_{1e} e AMY_{2b}) rispetto alle forme derivate (Tabella 1). Nel siero di soggetti normali, P-AMY rappresenta mediamente circa il 40-50% dell'attività totale, mentre S-AMY corrisponde al restante 50-60% (9). In circa il 25-30% degli individui sono inoltre presenti altre isoforme derivate prevalentemente dall'isoenzima S-AMY. Non si riscontrano diversità legate al sesso, sia per quanto riguarda la concentrazione che la distribuzione isoenzimatica, come del resto non esistono neppure per l'AMY totale (10).

L'isoenzima S è presente nel siero già nella vita fetale; alla nascita si hanno valori pari a circa il 30% dell'adulto che si mantengono tali fino al quarto mese e raggiungono i valori dell'adulto verso i due anni (11). Al contrario la frazione P è praticamente assente alla nascita e si evidenzia solo dopo il terzo mese di vita, raggiungendo i valori dell'adulto verso i cinque anni (11). Ciò riflette probabilmente lo sviluppo postnatale della funzione esocrina del pancreas.

Poco si conosce del normale meccanismo di rilascio dell'AMY nel sangue. L'aumento dell'attività enzimatica nel siero in corso di pancreatite acuta risulta probabilmente dalla fuoriuscita dell'enzima nel tessuto interstiziale della ghiandola e dal suo successivo passaggio nel sangue attraverso i vasi del sistema linfatico, anche se un passaggio diretto dell'enzima nei vasi sanguigni che drenano il pancreas è probabilmente verosimile nella fase

Tabella 1
Frequenza dei diversi quadri isoamilasici nel siero di soggetti sani

Quadro isoenzimatico	No. soggetti 234	Maschi 95	Femmine 139
AMY _{2b} , AMY _{1e}	175 (74.8%)	68 (71.6%)	107 (77.0%)
AMY _{2b} , AMY _{1e} , AMY _{1d}	40 (17.1%)	18 (18.9%)	22 (15.8%)
AMY2-B*, AMY _{2b} , AMY _{1e}	11 (4.7%)	5 (5.3%)	6 (4.3%)
AMY2-B, AMY _{2b} , AMY _{1e} , AMY _{1d}	5 (2.1%)	2 (2.1%)	3 (2.1%)
AMY _{2b} , AMY _{1e} , AMY _{1d} , AMY _{1c}	2 (0.9%)	1 (1.1%)	1 (0.7%)

*AMY2-B è la principale variante genetica del locus AMY-2, spesso contrassegnata come P1

iniziale della malattia (12). L'eliminazione dal circolo ematico dell'enzima è molto rapida; durante un rilascio acuto, la sua emivita infatti non supera in media le 15 ore. Questo dato assume rilevanza dal punto di vista clinico; infatti tale breve emivita consente di utilizzare il dosaggio della P-AMY oltre che nella fase diagnostica anche nel monitoraggio dell'evoluzione della pancreatite acuta, in quanto una persistenza di valori elevati di tale isoenzima nel plasma è indice probabile della mancata risoluzione del danno pancreatico, e quindi di un persistente rilascio enzimatico, più che di una rallentata eliminazione. Viceversa, in caso di pancreatite acuta non complicata, usualmente di tipo edematoso, una rapida caduta dell'attività enzimatica nel siero può essere aspettata.

Relativamente al catabolismo, solo circa il 25-30% dell'AMY circolante nel sangue è escreta con le urine, mentre la maggior parte sarebbe eliminata dal sistema reticolo-endoteliale, principalmente a livello epatico. In particolare, le strutture carboidratiche presenti sull'isoenzima S-AMY ne consentirebbero il riconoscimento e la rapida eliminazione da parte di specifici recettori epatici. A livello renale, l'AMY è rapidamente filtrata dai glomeruli e probabilmente parzialmente riassorbita dai tubuli (13). Dei due tipi di isoenzimi, la P-AMY ha una clearance renale quattro volte maggiore rispetto alla S-AMY (14). La ragione di questa diversità non è del tutto nota. Probabilmente differenze nella carica elettrica e nella lipofilità molecolare tra i due isoenzimi possono in parte spiegarla (14). Di fatto, in corso di patologia renale in cui si abbia perdita della proprietà di selettività elettrica della membrana basale glomerulare, tale differenza nell'escrezione urinaria dei due isoenzimi si attenua notevolmente.

Relativamente alla variabilità biologica degli isoenzimi dell'AMY, sono noti i dati relativi alla P-AMY che è poi l'isoenzima più importante dal punto di vista clinico. Per quanto riguarda la variabilità biologica intraindividuale, che esprime la fluttuazione della concentrazione di un determinato analita intorno al punto omeostatico proprio di un singolo individuo, sono stati riportati valori compresi tra il 9% e il 14%, con media di 11.7% (15-17). Per la variabilità biologica interindividuale sono stati ottenuti valori intorno al 30%. La prevalenza della variabilità interindividuale sulla intraindividuale indica anche la scarsa utilità di considerare l'intervallo di riferimento della P-AMY nel senso tradizionale per la valutazione clinica del parametro, proprio a causa della elevata diversità tra gli individui.

METODI ANALITICI

Dal momento della scoperta dell'eterogeneità dell'AMY, sono stati messi a punto vari metodi per la determinazione delle sue forme molecolari. Si possono distinguere metodi separativi, non separativi ed immunologici.

a) Metodi Separativi

La tecnica elettroforetica è stata una delle tecniche più

largamente usate per la separazione degli isoenzimi dell'AMY, sebbene tale separazione risulti complessivamente più difficoltosa di quella di altri isoenzimi, quali per esempio quelli della creatin chinasi o della lattato deidrogenasi (18). I supporti maggiormente usati sono l'agarosio, la poliacrilammide e l'acetato di cellulosa. Quest'ultimo è forse il più utilizzato perchè abbina una buona risoluzione alla relativa velocità di separazione ed alla facilità d'uso (19). Quale che sia il tipo di supporto utilizzato, la colorazione delle bande viene effettuata sfruttando una sospensione di colorante legata all'amido come substrato.

I due gruppi di isoenzimi S e P riscontrabili nel siero umano migrano elettroforeticamente nelle stesse zone dove migrano rispettivamente le isoamilasi della saliva e quelle del secreto pancreatico e questo consente una sicura identificazione delle isoamilasi nel siero umano. Tuttavia, sebbene la determinazione elettroforetica fornisca risoluzioni ottimali delle varie forme isoamilasiche, questa procedura è senza dubbio di difficile applicazione a situazioni di emergenza quando debba essere presa una rapida decisione clinica.

Anche l'isoelettrofocalizzazione, come l'elettroforesi, si basa sulla diversa migrazione di molecole proteiche caricate elettricamente, ma in questo caso la migrazione si svolge in gradiente continuo di pH ottenuto con l'impiego di particolari sostanze dette anfoline. Ad un pH caratteristico per ogni singola proteina, corrispondente al suo punto isoelettrico, la carica netta diventa zero, la migrazione si interrompe e la proteina rimane focalizzata in quel punto. Anche per eseguire l'isoelettrofocalizzazione si possono usare vari supporti quali agarosio, acetato di cellulosa e poliacrilammide, che possono essere preparati o acquistati già pronti con le anfoline inglobate. Questo metodo ha un tempo di esecuzione abbastanza lungo e richiede una buona manualità e apparecchiatura adatta comprendente un alimentatore ad alto voltaggio ed un sistema di raffreddamento della vasca elettroforetica. Con questa tecnica si ottengono risoluzioni molto elevate, anche se i risultati ottenuti dai vari autori non sono perfettamente concordanti in quanto la tecnica è piuttosto delicata e può essere influenzata da molti fattori (Tabella 2).

La tecnica cromatografica è stata impiegata in fase relativamente pionieristica per l'isolamento, l'individuazione e la caratterizzazione delle proprietà fisico-chimiche delle frazioni isoenzimatiche. Con questa tecnica si individuano sostanzialmente due frazioni riconducibili agli isoenzimi S e P.

b) Metodi Non Separativi

Nel 1977, O'Donnell et al. (25) descrissero un metodo di inibizione selettiva per determinare gli isoenzimi della AMY che si basava sull'uso di un inibitore della frazione S, ricavato dal grano (*Triticum aestivum*). Con una doppia determinazione della attività amilasica, in assenza ed in presenza dell'inibitore, si determinava l'attività amilasica totale e quella pancreatica. Studi successivi hanno tuttavia

Tabella 2

Punti isoelettrici delle principali isoforme dell'amilasi, secondo differenti autori

Autore	AMY2-B	AMY _{2b}	AMY _{2a}	AMY _{1e}	AMY _{1d}	AMY _{1c}	AMY _{1b}
Takeuchi et al. (20)	-	7.02	6.51	6.45	5.98	-	-
Levitt et al. (21)	-	7.00	6.42	6.48	6.03	5.86	-
Warshaw & Lee (22)	-	7.27	6.73	6.73	6.13	5.67	5.23
Royse & Jensen (23)	-	7.00	6.10	6.30	6.00	5.70	-
Chiarioni et al. (24)	7.30	7.00	6.10	6.30	5.90	-	-

dimostrato che l'inibizione della frazione S non era completa, per cui nel metodo si aveva una significativa sovrastima della frazione P.

c) Metodi Immunochimici

Tentativi preliminari di differenziare le due componenti isoenzimatiche dell'AMY mediante tecniche immunologiche fallirono per l'impossibilità di produrre antisieri policlonali che fossero sufficientemente specifici per una delle due frazioni. Nel 1985, quattro gruppi di ricercatori riportarono contemporaneamente la produzione di anticorpi monoclonali con una specificità virtuale del 100% rispetto ad uno dei due isoenzimi. Da allora, l'impiego degli anticorpi monoclonali nelle procedure analitiche ha praticamente rivoluzionato l'orizzonte relativo all'impiego clinico della determinazione degli isoenzimi dell'AMY. Nuovi metodi basati sull'uso di questi anticorpi specifici hanno offerto indubbi vantaggi di precisione, affidabilità, semplicità e velocità, sebbene nessun metodo immunochimico è finora riuscito a discriminare singolarmente le varie isoforme pancreatiche o salivari limitandosi a determinare in maniera selettiva solamente i due gruppi isoenzimatici S e P.

La pietra miliare del progresso analitico nel campo degli isoenzimi dell'AMY può essere considerata la produzione da parte del gruppo di ricerca tedesco della Boehringer Mannheim di un anticorpo monoclonale, contrassegnato dalla sigla 88E8, capace non solo di riconoscere ma anche di inibire specificamente l'isoenzima S-AMY (26). Ciò ha consentito non solo di pensare i metodi immunochimici nelle tradizionali forme di immunoprecipitazione o di determinazione immunoenzimatica, laddove l'anticorpo era solo legante l'isoenzima, ma di confezionare un metodo 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 (66C7) ha permesso di ottenere un metodo, commercializzato nel 1987, che, pur possedendo una specificità praticamente assoluta per l'isoenzima P-AMY, ha le stesse caratteristiche di una procedura per la determinazione dell'attività totale dell'enzima (27). L'unica vera limitazione di questo metodo è rappresentata dall'impossibilità di distinguere un'iperamilasemia dovuta a presenza di "macroamilasi" da un aumento dovuto all'isoenzima P-AMY. Ciò è probabilmente in parte dovuto all'incapacità degli anticorpi impiegati nel

test di riconoscere ed inibire l'isoenzima S-AMY, qualora esso sia legato nel macrocomplesso e l'epitopo di reazione sia di conseguenza mascherato o modificato. In questo caso, solamente un'indagine elettroforetica è in grado di rilevare direttamente la presenza del macrocomplesso.

Un breve cenno meritano infine recenti dati ottenuti con metodologie immunochimiche che, mediante il dosaggio della concentrazione della massa proteica degli isoenzimi invece della loro attività catalitica, sembrano dimostrare una perfetta correlazione tra attività enzimatica sierica e massa proteica per entrambe gli isoenzimi dell'AMY e quindi l'assenza di molecole inattive dell'enzima nel plasma umano.

STABILITA' DEGLI ISOENZIMI

L'attività enzimatica totale nel siero rimane inalterata conservando il campione in frigorifero a 4°C per parecchie settimane. Tuttavia, anche se l'attività amilasica totale rimane pressochè inalterata, una conservazione troppo prolungata del campione in frigorifero può alterare la separazione elettroforetica e i rapporti dei due gruppi di isoforme a causa di una probabile perdita di gruppi ammidici. Tali alterazioni non si hanno se il campione è conservato a -20°C in congelatore. D'altro canto, problemi di conservazione del campione non esistono per quei metodi, come l'immunochimico, che si limitano a separare i due isoenzimi S e P e non le loro isoforme.

UTILITA' CLINICA

a) Pancreatite Acuta

La diagnosi delle affezioni acute del pancreas è notoriamente difficile data la relativa inaccessibilità di questo organo e l'aspecificità dei sintomi associati alla patologia pancreatica. Il clinico si può trovare di fronte ad un ampio spettro di situazioni che vanno dal lieve edema pancreatico, sovente asintomatico, caratterizzato da autoremissione e da decorso monofasico, fino alla pancreatite emorragica necrotizzante in cui la dimensione della zona necrotica è in qualche modo correlata con la severità dell'attacco e in cui possono essere presenti complicazioni sistemiche.

Nel cosiddetto "addome acuto" il clinico deve orientarsi tra una gamma molto varia di patologie. E' stato calcolato che le possibili cause di insorgenza di addome acuto

ammontano a più di 200: tra le principali, oltre alla pancreatite (causa di addome acuto nel 6% e nel 13% delle femmine e dei maschi, rispettivamente), coliche biliari e/o colecistite acuta (40% e 32% nei due sessi), occlusione intestinale (12% e 18%), appendicite (10% e 28%), diverticolite (8% e 9%) e, nelle donne, anche salpingite e gravidanza ectopica. Il paziente lamenta un dolore epigastrico incessante e talvolta anoressia, nausea e vomito. Arrivare tempestivamente alla diagnosi è di importanza critica, poiché alcune patologie sono correggibili chirurgicamente, mentre altre, tra cui la pancreatite acuta, possono comportare un rischio chirurgico anche grave.

Nel caso della pancreatite acuta, la diagnosi definitiva è basata sulla dimostrazione a livello istologico di un quadro infiammatorio all'interno del pancreas. Tuttavia, spesso l'esame istologico non è ovviamente disponibile e, quindi, la diagnosi deve forzatamente basarsi su dati di tipo clinico, supportati da indagini radiografiche e di laboratorio.

Il test di laboratorio più utilizzato nella diagnosi di pancreatite acuta è tuttora rappresentato dalla determinazione dell'AMY totale nel siero. In pratica, l'associazione di aumentata attività dell'AMY totale nel siero con peculiari caratteristiche cliniche quali il dolore addominale è divenuta *de facto* lo standard diagnostico della pancreatite acuta. Di conseguenza, la diagnosi differenziale della pancreatite è spesso riconducibile alla diagnosi differenziale dell'iperamilasemia, condizione biochimica la cui interpretazione richiede la conoscenza dell'origine tissutale dell'AMY sierica e dei fattori che provocano il suo rilascio dai tessuti e la sua eliminazione dalla circolazione. Un aumento dell'AMY sierica totale può rappresentare un riscontro comune in più di venti condizioni patologiche oltre alla pancreatite acuta. Circa la metà di queste condi-

zioni può essere confusa dal punto di vista clinico con una pancreatite acuta e circa il 30% dei pazienti che presentano dolore addominale ed aumento dell'AMY totale nel siero possono essere affetti da patologie diverse dalla pancreatite acuta, quali ad esempio la colecistite acuta, l'ostruzione intestinale, l'infarto mesenterico, ecc. (28). L'aumento della concentrazione sierica dell'AMY totale è quindi da considerarsi poco specifico per la diagnosi di pancreatite acuta ed è pertanto intuitivo l'interesse diagnostico della determinazione dell'isoenzima pancreatico.

Tipico del paziente con pancreatite acuta è l'aumento dell'attività dell'isoenzima pancreatico nel siero, un dato che è ottenibile con tutti i metodi analitici conosciuti. Tuttavia, solo con la disponibilità dei metodi basati sull'inibizione selettiva, dapprima ottenuta con l'inibitore ricavato dal grano e successivamente con specifici anticorpi monoclonali, si è potuto realmente stimare il valore di efficienza diagnostica della determinazione della P-AMY nella diagnosi di pancreatite acuta (Tabella 3). In generale, ad una 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 probabilmente diminuisce o impedisce un'efficiente inibizione delle forme salivari (34). Bisogna ricordare inoltre che il dosaggio degli isoenzimi dell'AMY non è in grado di riconoscere l'eventuale origine intestinale di un'iperamilasemia. L'intestino contiene infatti P-AMY, per cui al verificarsi di soluzioni di continuità della barriera intestinale (ischemia, perforazione, occlusione, ecc.), l'AMY che passa in circolo è ovviamente P-AMY. In tali circostanze la

Tabella 3

Sensibilità, specificità ed efficienza clinica della determinazione dell'amilasi pancreatica nella diagnosi di pancreatite acuta

Autore	Criterio di selezione della popolazione (prevalenza di pancreatite acuta)	Metodo	Livello decisionale (x LSR*)	Sensibilità, %	Specificità, %	Efficienza %
Steinberg et al. (29)	Dolore addominale (23%)	IS**	1 2	92.3 84.0	85.1 96.5	87.3 92.9
Tietz et al. (30)	Iperamilasemia (38%)	IS	1	86.2	82.9	84.2
Moleir-Petersen et al. (31)	Dolore addominale (5.8%)	IS	4.7	89.8	99.6	99.1
Ventrucci et al. (32)	Dolore addominale (34%)	IS	1 1.4	97.1 91.2	89.4 97.0	95.0 92.0
Van Lente & Kazmierczak (33)	Dolore addominale (37%)	IP	3	89.0	91.0	93.0
Panteghini & Pagani (34)	Iperamilasemia (62.8%)	II	5	100.0	50.0	81.4
Van Ingen & Sanders (35)	Dolore addominale (47%)	II	3.1	93.0	97.0	?
Huguet et al. (36)	Dolore addominale (14%)	II	1 3 5	96.0 79.0 69.0	88.0 98.0 99.0	? ? ?
Turcotte et al. (37)	Dolore addominale (5.5%)	II	1	85.5	92.5	90.8
Clavé et al. (38)	Dolore addominale (18.5%)	II	1 3	? ?	? ?	90.6 97.6
Ignjatovic et al. (39)	Dolore addominale (45%)	II	3.6	91.5	91.7	91.6

* LSR = limite superiore di riferimento.

** IS = inibizione selettiva con inibitore da germe di grano; IP = immunoprecipitazione; II = immunoinibizione

determinazione dell'isoenzima pancreatico dell'AMY non è probabilmente in grado di chiarire l'origine clinica dell'iperamilasemia (Fig. II). In definitiva, questo test si è dimostrato particolarmente utile per la diagnosi delle iperamilasemie di origine extrapancreatica (il cosiddetto quadro "salivare") nelle quali l'isoenzima pancreatico non è aumentato (28). Di conseguenza, l'impiego di questo dosaggio potrebbe se non altro ridurre la necessità di ulteriori indagini di laboratorio e radiografiche in quei pazienti con iperamilasemia associata a condizioni quali dolore addominale aspecifico, abuso acuto di alcool e patologie delle ghiandole salivari, che rappresentano circa il 12% del totale delle iperamilasemie (28).

Come già detto, gli isoenzimi dell'AMY, una volta rilasciati dagli organi che li producono, vanno incontro ad una serie di modificazioni postsintetiche che danno origine a forme derivate, alcune delle quali sembra abbiano un'elevata specificità come indicatori di uno stato infiammatorio del pancreas. In particolare, l'isoforma AMY_{2a}, spesso in letteratura contrassegnata come P3, è aumentata in un'elevata percentuale di pazienti con pancreatite acuta, probabilmente perchè essa prende direttamente origine da processi proteolitici intrapancreatici interessanti l'isoenzima pancreatico (19, 40). Negli ultimi anni ne è stata valutata la specificità clinica nella diagnostica delle patologie pancreatiche acute (Tabella 4). La determinazione dell'attività dell'isoforma AMY_{2a} nel siero si è dimostrata indubbiamente utile nel confermare o escludere la pancreatite acuta in pazienti con iperamilasemia di origine dubbia. Tuttavia, l'utilizzo clinico di questo dosaggio è tuttora limitato da problematiche di tipo metodologico, rappresentate dall'innegabile indaginosità della procedura

elettroforetica, il solo metodo finora in grado di separare l'isoenzima P-AMY nelle sue varie isoforme.

Nella pancreatite acuta l'AMY totale raggiunge il massimo livello nei primi due giorni dall'insorgenza della sintomatologia dolorosa e poi decresce rapidamente. Seguendo per alcuni giorni tali pazienti si nota invece che la normalizzazione dell'attività della P-AMY avviene in un tempo più lungo che non la normalizzazione del valore dell'AMY totale. Questo comportamento dimostra che, 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 (34). Nella nostra casistica clinica, mentre il 70% dei pazienti con pancreatite acuta non complicata mostra dopo una settimana dall'esordio della malattia valori di AMY totale nella norma, solamente il 20% degli stessi pazienti mostra allo stesso tempo un valore normalizzato della P-AMY. Di conseguenza, questo prolungato aumento dell'isoenzima pancreatico nel siero rende probabilmente ridondante 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.

Recentemente è stata messa in evidenza la possibile importanza dell'isoforma AMY_{2a} (o P3) nel "follow up" della malattia pancreatiche acuta (42). L'eventuale persistenza di un valore elevato di tale frazione dopo la prima settimana di decorso ed alla dimissione del paziente è correlata con una frequenza significativamente aumentata di complicazioni (formazioni di pseudocisti pancreatiche, ricorrenza della pancreatite, decesso) (43). In particolare, la valutazione dell'isoforma AMY_{2a} sembra utile nell'eviden-

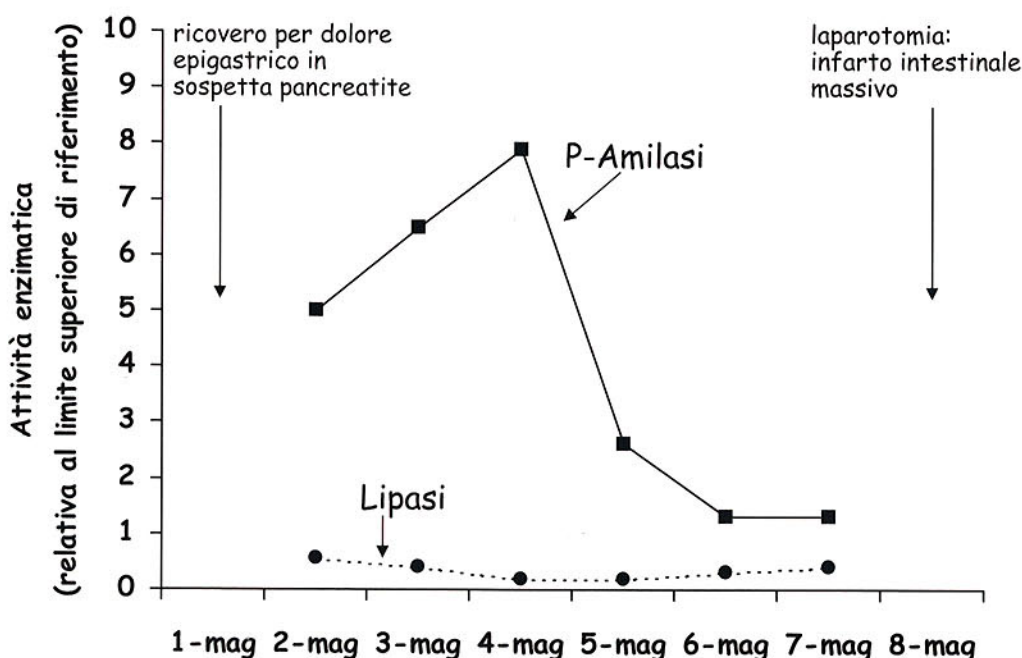


Figura II

Evoluzione del quadro enzimatico pancreatico sierico (amilasi e lipasi pancreatiche) in un caso di grave infarto intestinale. Si evidenzia un significativo aumento dell'amilasi pancreatica, attribuibile al rilascio dell'enzima da parte dell'intestino necrotico, associato alla normalità della concentrazione sierica della lipasi pancreatica, indice di assenza di compromissione pancreatica

Tabella 4

Sensibilità, specificità ed efficienza clinica della determinazione dell'isoforma AMY_{2a} (P3) dell'amilasi pancreatica nella diagnosi di pancreatite acuta

Autore	Criterio di selezione della popolazione prevalenza di pancreatite acuta)	Metodo	Sensibilità, %	Specificità, %	Efficienza, (%)
Massey (19)	Dolore addominale (7.7%)	Elettroforesi su acetato di cellulosa	90	98.0	98.0
Panteghini & Pagani (40)	Dolore addominale e iperamilasemia (70.4%)	Elettroforesi su acetato di cellulosa	100.0	75.0	92.6
Lott et al. (41)	Dolore addominale (33%)	Elettroforesi su agarosio	70.7	90.4	83.9

ziare pazienti con pancreatite che abbiano sviluppato formazioni pseudocistiche (44). Quando la sua percentuale rispetto all'attività amilasica totale del siero alla fine della prima settimana di decorso sia ancora superiore al 15% esiste un'elevata possibilità che il paziente abbia formato una pseudocisti (sensibilità pari a 80-90% dei casi) (45).

Nel 25% dei casi di colangio-pancreatografia endoscopica retrograda si ha un significativo innalzamento (oltre 3-4 volte il limite superiore di riferimento) dell'AMY totale nel siero, che è totalmente a carico dell'isoenzima P-AMY (46). In particolare, è il grado di opacificazione del sistema duttale pancreatico ottenuto durante la procedura che si correla con la possibile presenza di anomalie della concentrazione sierica di P-AMY. E' evidente quindi anche in questo caso l'importanza del dosaggio isoenzimatico per la messa in evidenza di una manifestazione clinica che probabilmente è solo quantitativamente diversa da una franca pancreatite acuta, pur mantenendone le stesse caratteristiche patogenetiche.

Si può avere un innalzamento dell'AMY totale anche a seguito di interventi chirurgici che non coinvolgono né il pancreas né gli organi limitrofi. In questi casi spesso la separazione isoenzimatica mostra un innalzamento della frazione S. Qualche autore ha ipotizzato, come causa di questo aumento, l'effetto dell'anestesia e dell'intubazione sulle ghiandole parotidiche. In questi casi la separazione isoenzimatica serve ad escludere reali complicazioni pancreatiche post-operatorie.

Tabella 5

Sensibilità, specificità ed efficienza clinica della determinazione dell'amilasi pancreatica nella diagnosi di pancreatite cronica ed insufficienza pancreatica

Autore	Metodo	Livello decisionale	Prevalenza	Sensibilità, %	Specificità, %	Efficienza, %
Enslev et al. (47)	Elettroforesi su agarosio	LIR*	25/80 (PC)**	48	98	82
			17/80 (IP)	59	95	87
Lesi et al. (48)	Elettroforesi su acetato di cellulosa	P-AMY <30%	25/69 (PC)	0	100	-
			12/69 (IP)	83	100	97
Moller-Petersen et al. (49)	Inibizione selettiva (germe di grano)	LIR	36/105 (PC)	39	94	75
			24/105 (IP)	58	94	73

*LIR = limite inferiore di riferimento.

**PC = pancreatite cronica; IP = insufficienza pancreatica

b) Pancreatite Cronica

Nella pancreatite cronica, malattia di difficile diagnosi in cui si ha una distruzione del parenchima pancreatico e la sua sostituzione con tessuto connettivo sclerotico, si hanno valori normali di AMY totale mentre la separazione isoenzimatica può mostrare una diminuzione della frazione P, prevalentemente però quando si sia già sviluppata una severa insufficienza pancreatica. Sostanzialmente, un valore di P-AMY nel siero inferiore al limite inferiore di riferimento possiede un'elevata specificità per la pancreatite cronica e quindi un elevato valore predittivo positivo, mancando tuttavia il test di accettabile sensibilità clinica, specie quando non sia ancora presente una conclamata insufficienza esocrina dell'organo (Tabella 5).

c) Tumori

Nel caso di tumori dell'ovaio, e meno comunemente, del polmone, della prostata, del pancreas e nel mieloma multiplo sono stati riscontrati aumenti dell'AMY totale, che risultano a carico dell'isoenzima S-AMY. In particolare, nel caso di neoplasie sierose dell'ovaio, si presentano aumentate le isoforme salivari deaminate a migrazione elettroretica più anodica (AMY_{1c}, AMY_{1b}, AMY_{1a}).

d) Insufficienza Renale

I pazienti con dolore addominale, iperamilasemia ed

insufficienza renale rappresentano un particolare problema diagnostico. L'insufficienza renale, infatti, causa una diminuita clearance di tutte le proteine sieriche di piccole dimensioni, inclusa la P-AMY. Di conseguenza, modesti aumenti (di norma <5 volte il limite superiore di riferimento) di questo enzima si possono osservare in pazienti con insufficienza renale anche in assenza di patologie pancreatiche (50). Al contrario, aumenti della P-AMY nel siero superiori a 5 volte il limite superiore di riferimento sono indice della presenza di una pancreatite acuta anche in questi soggetti. D'altro canto, la diminuita escrezione renale dell'enzima in corso di insufficienza renale cronica, aumentando la sua permanenza in circolo, facilita la conversione post-traduzionale dell'isoenzima AMY_{2b} nell'isoforma AMY_{2a} (o P3), che quindi è presente in significative quantità nel sangue di questi pazienti, anche in assenza di patologie pancreatiche.

e) Macroamilasemia

Deve essere infine ricordata una condizione di aumentata attività amilasica nel siero (in media 1,5-8 volte il limite superiore di riferimento) che non corrisponde tuttavia ad una reale patologia, ma rappresenta un'anomalia biochimica benigna. Questa situazione è dovuta alla presenza in circolo di complessi ad elevato peso molecolare ("macroamilasi") costituiti da amilasi salivare o pancreatiche legate ad immunoglobuline (IgG o IgA) attraverso uno specifico legame antigene-anticorpo. Di conseguenza, mentre l'AMY normalmente passa attraverso il filtro renale, quando si forma il legame con le immunoglobuline il peso molecolare del complesso aumenta diventando troppo voluminoso per filtrare attraverso il rene. Si ritiene che una macroamilasemia sia presente in circa l'1% della popolazione. Individui che per mesi o anni hanno presentato iperamilasemia sono da considerare possibili portatori di macroamilasi, la quale deve essere correttamente diagnosticata mediante la dimostrazione della sua presenza nel siero, ottenibile per via elettroforetica. L'elettroforesi del siero di questi soggetti mostra infatti un'unica grossa banda allungata che contrasta con la compattezza delle bande isoenzimatiche ottenute sottoponendo a migrazione un siero normale. Quando la separazione elettroforetica non sia disponibile, l'impiego della metodica di precipitazione del macrocomplesso con una soluzione di polietilenglicole (PEG) 6000, 240 g/L, può fornire un buon mezzo per evidenziare la presenza di una "macroamilasi" (51). In questo caso, l'attività amilasica residua nel sovratanante dopo trattamento del siero con PEG non deve superare il 30% dell'attività enzimatica totale.

BIBLIOGRAFIA

- Nakamura Y, Ogawa M, Nishide T, et al. Sequences of cDNAs for human salivary and pancreatic α -amylases. *Gene* 1984;28:263-70.
- Horii A, Emi M, Tomita M, et al. Primary structure of human pancreatic alpha-amylase gene: its comparison with human salivary alpha-amylase gene. *Gene* 1987;60:57-64.
- Omichi K, Ikenaka T. Difference in transglycosylation between human pancreatic and salivary α -amylases. *J Biochem* 1983;94:1797-802.
- Brock A, Mortensen PB, Mortensen BB, Roge HR. Familial occurrence of diminished pancreatic amylase in serum - a "silent" AMY-2 allelic variant? *Clin Chem* 1988;34:1516-7.
- Keller PJ, Kauffman DL, Allan BJ, Williams BL. Further studies on the structural differences between the isoenzymes of human parotid α -amylase. *Biochemistry* 1971;10:4867-74.
- Karn RG, Shulkin JD, Merrit AD, et al. Evidence for post-translational modification of human salivary amylase (AMY1) isoenzymes. *Biochem Genet* 1973;10:341-50.
- Whitten RO, Chandler WL, Thomas MGE, et al. Survey of α -amylase activity and isoamylases in autopsy tissue. *Clin Chem* 1988;34:1552-55.
- Apple F, Benson P, Preese L, et al. Lipase and pancreatic amylase activities in tissues and in patients with hyperamylasemia. *Am J Clin Pathol* 1991;96:610-4.
- Otsuki M, Saeki S, Yuu H, Maeda M, Baba S. Electrophoretic pattern of amylase isoenzymes in serum and urine of normal persons. *Clin Chem* 1976;22:439-44.
- Panteghini M, Malchiodi A. Relation of age to isoenzyme patterns of amylase in serum. *La Ricerca Clin Lab* 1984;14:449-52.
- Gillard KB, Simbala JA, Goodglick L. Reference intervals for amylase isoenzymes in serum and plasma of infants and children. *Clin Chem* 1983;29:1119-23.
- Mayer AD, Airey M, Hodgson J, McMahon J. Enzyme transfer from pancreas to plasma during acute pancreatitis. The contribution of ascitic fluid and lymphatic drainage of the pancreas. *Gut* 1985;26:876-81.
- Junge W, Malyusz M, Ehrens HJ. The role of the kidney in the elimination of pancreatic lipase and amylase from blood. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985;23:387-92.
- Wetzels JFM, Hafkenscheid JCM, Hessels M, Hoitsma AJ, Koene RAP. Renal clearance of pancreatic and salivary amylase relative to creatinine clearance in patients with renal disease and proteinuria. *Clin Chem* 1988;34:589-91.
- Cummings ST, Fraser CG. Total amylase and pancreatic isoamylase in serum and urine: considerations from data on biological variation. *Ann Clin Biochem* 1989;26:335-40.
- Huguet J, Fuentes-Arderiu X. Biological variation in the catalytic concentration of pancreatic α -amylase and triacylglycerol lipase in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1991; 51:735-8.
- Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biological variation: pros, cons, and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;5:491-500.
- Mifflin TE, Hortin G, Bruns DE. Electrophoretic assays of amylase isoenzymes and isoforms. *Clin Lab Med* 1986;6:583-99.
- Massey TH. Efficiency in the diagnosis of acute pancreatitis increased by improved electrophoresis of amylase isoenzyme P3 on cellulose acetate. *Clin Chem* 1985;31:70-5.
- Takeuchi T, Matsushima T, Sugimura T. Separation of human α -amylase isozymes by electrofocusing and their immunological properties. *Clin Chim Acta* 1975;60:207-13.
- Levitt MD, Ellis C, Engel RR. Isoelectric focusing studies of human serum and tissue isoamylases. *J Lab Clin Med* 1977;90:141-52.
- Warshaw AL, Lee KH. Characteristic alterations of serum isoenzymes of amylase in diseases of liver, pancreas, salivary gland, lung, and genitalia. *J Surg Res* 1977;22:362-9.
- Royse VL, Jensen DM. Development of an agarose gel electrophoresis technique for determining α -amylase

- isoenzymes. *Clin Chem* 1984;30:387-90.
24. Chiarioni G, Vaona B, Benini L, et al. Isoamylase determination by isoelectric focusing in pancreatic disorders. *Int J Pancreatol* 1991;8:75-83.
 25. O'Donnell MD, FitzGerald O, McGeeney KF. Differential serum amylase determination by use of an inhibitor, and design of a routine procedure. *Clin Chem* 1977;23:560-6.
 26. Gerber M, Naujoks K, Lenz H, Wulff K. A monoclonal antibody that specifically inhibits human salivary α -amylase. *Clin Chem* 1987;33:1158-62.
 27. Rauscher E, Gerber M. Pancreatic α -amylase assay employing the synergism of two monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta* 1989;183:41-4.
 28. Panteghini M. Diagnostic value of measuring serum pancreatic enzymes in hyperamylasemia. *Progr Med Lab* 1991;5:161-7.
 29. Steinberg WM, Goldstein SS, Davis ND, Shamma'a J, Anderson K. Diagnostic assays in acute pancreatitis. A study of sensitivity and specificity. *Ann Intern Med* 1985;102:576-80.
 30. Tietz NW, Huang WY, Rauh DF, Shuey DF. Laboratory tests in the differential diagnosis of hyperamylasemia. *Clin Chem* 1986;32:301-7.
 31. Moller-Petersen J, Klaerke M, Dati F. Evaluation and comparison of cathodic trypsin-like immunoreactivity, pancreatic lipase and pancreatic isoamylase in the diagnosis of acute pancreatitis in 849 consecutive patients with acute abdominal pain. *Clin Chim Acta* 1986;157:151-66.
 32. Ventrucci M, Pezzilli R, Gullo L, Platé L, Sprovieri G, Barbara L. Role of serum pancreatic enzyme assays in diagnosis of pancreatic disease. *Dig Dis Science* 1989;34:39-45.
 33. 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.
 34. 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.
 35. Van Ingen HE, Sanders GTB. Clinical evaluation of a pancreatic lipase mass concentration assay. *Clin Chem* 1992;38:2310-3.
 36. Huguet J, Castineiras MJ, Fuentes-Arderiu X. Diagnostic accuracy evaluation using ROC curve analysis. *Scan J Clin Lab Invest* 1993;53:693-9.
 37. Turcotte GE, Nadeau L, Forest JC, et al. A new rapid immunoinhibition pancreatic amylase assay: diagnostic value for pancreatitis. *Clin Biochem* 1994;27:133-9.
 38. Clavé P, Guillaumes S, Blanco I, et al. Amylase, lipase, pancreatic isoamylase, and phospholipase A in diagnosis of acute pancreatitis. *Clin Chem* 1995;41:1129-34.
 39. 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.
 40. Panteghini M, Pagani F. Diagnostic value of measuring pancreatic lipase and the P3 isoform of the pancreatic amylase isoenzyme in serum of hospitalized hyperamylasemic patients. *Clin Chem* 1989;35:417-21.
 41. Lott JA, Ellison EC, Applegate D. The importance of objective data in the diagnosis of pancreatitis. *Clin Chim Acta* 1989;183:33-40.
 42. Panteghini M, Pagani F. Time course of changes in serum activity of the P3 isoform of pancreatic amylase isoenzyme in patients with acute pancreatitis. *Clin Biochem* 1989;22:479-82.
 43. Navarro S, Aused R, Casals E, et al. Value of the P3 amylase fraction as an indicator of the long-term prognosis of acute pancreatitis. *Br J Surg* 1987;74:405-7.
 44. Warshaw AL, Lee KH. Aging changes of pancreatic isoamylases and the appearance of "old amylase" in the serum of patients with pancreatic pseudocysts. *Gastroenterology* 1980;79:1246-51.
 45. Weaver DW, Bouwman DL, Walt AJ, et al. Aged amylase. A valuable test for detecting and tracking pancreatic pseudocysts. *Arch Surg* 1982;117:707-11.
 46. Panteghini M, Pagani F, Alebardi O, Lancini G, Cestari R. Time course of changes in pancreatic enzymes, isoenzymes, and isoforms in serum after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Clin Chem* 1991;37:1602-5.
 47. Enslev L, Nyboe Andersen B, Fahrenkrug J, Magid E, Thorsgaard-Pedersen N. Serum immunoreactive trypsin, pancreatic polypeptide, and pancreatic isoamylase as diagnostic tests for chronic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1984;19:204-8.
 48. Lesi C, Melzi D'Eiril GV, Pavesi F, et al. Clinical significance of serum pancreatic enzymes in the quiescent phase of chronic pancreatitis. *Clin Biochem* 1985;18:235-8.
 49. Moller-Petersen J, Pedersen JO, Thorsgaard-Pedersen N, Nyboe Andersen B. Serum cathodic trypsin-like immunoreactivity, pancreatic lipase, and pancreatic isoamylase as diagnostic tests of chronic pancreatitis or pancreatic steatorrhea. *Scand J Gastroenterol* 1988;23:287-96.
 50. Lin XZ, Chen TW, Wang SS, et al. Pancreatic enzymes in uremic patients with or without dialysis. *Clin Biochem* 1988;21:189-92.
 51. Van Deun A, Cobbaert C, Van Orshoven A, Claeys G, Lissens W. Comparison of some recent methods for the differentiation of elevated serum amylase and the detection of macroamylasaemia. *Ann Clin Biochem* 1989;26:422-26.