

Indicación de uso

Para la determinación cuantitativa cinética de α -amilasa actividad en suero humano mediante un procedimiento manual o automatizado.

Importancia clínica

La determinación de la actividad de la amilasa en el suero se realiza con mayor frecuencia para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades del páncreas.

Historia del Método

Amilasa se midió por primera vez cuantitativamente por un método iodométrico introducido por Wohlegemuth en 1908.¹ Somogyi introdujo un procedimiento en 1938 que estandarizó las cantidades de almidón y yodina.² Su trabajo se convirtió en la base de los métodos ampliamente utilizados amiloclásticos y sacarogénicos introducidos en 1956³ y 1960,⁴ respectivamente. Las desventajas de estos métodos incluye largos períodos de incubación, la interferencia de glucosa endógena, y los colores inestables de reacción que resulta en una mala reproducibilidad y confiabilidad. Rinderknecht et al introdujo un método de color – almidón en 1967⁵ el cual fue relativamente simple de realizar. Sin embargo, el procedimiento utiliza un sustrato insoluble, carecía de la linealidad, y además requiere centrifugación o filtración.

Procedimientos turbidimétrico han sido introducido⁶ que es relativamente rápido, pero que requieren instrumentación especial y tienen dificultad para producir soluciones de almidón estables y reproducibles.

Varios procedimientos enzimáticos han sido sugeridos^{7,8} incluyendo uno que utiliza el sustrato definido maltotetraosa.⁹ Estos métodos representan mejora significativa en la medición de la amilasa, pero todavía estaban sujetos a relativamente largos tiempos de pre-incubación, posibles interferencias de glucosa endógena, y una serie de otras posibles interferencias con la formación de NADH.¹⁰

Wallenfels et al¹¹ introdujeron p-nitrofenilglicosidos como sustrato definido de α -amilasa determinación en un procedimiento que elimina las interferencias de glucosa endógena y piruvato. Una variedad de enzimas de acoplamiento han sido utilizadas para hidrolizar los oligosacáridos de cadena corta, como resultado de la actividad de la amilasa en la muestra. Por desgracia, estas enzimas de acoplamiento contienen actividad correspondiente a la amilasa residual que afectó negativamente a la estabilidad de estos reactivos.

El presente método se basa en el uso de un sustrato cromagénico, 2 - cloro-p-nitrofenol vinculados con maltotriosa. La reacción de la amilasa con este sustrato resulta en la formación de 2-cloro-p-nitrofenol, que puede ser medido espectrofotométricamente a 405nm. Esta reacción se produce muy rápidamente, se requieren de enzimas no acopladas, y la reacción no es fácilmente inhibida por factores endógenos.

Principio



α -amilasa hidroliza el 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriosida (CNPG3) para liberar 2-cloro-nitrofenol y forma 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltosida (CNPG2), maltotriosa (G3) y glucosa (G). La velocidad de aumento de la absorbancia se mide a 405nm y es proporcional a la α -amilasa en la muestra.

Reactivos

Buffer MES, pH 6.0 \pm 0.1, 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-Maltotriose 1,8mM, Cloruro de sodio 350mM, acetato de calcio 6mM, tiocianato de potasio 900mM, azida de sodio al 0.1% (ver "Precauciones").

Preparación de los reactivos

El reactivo se presenta como un producto listo para usar como líquido. No requiere preparación.

Reactivo de almacenamiento

1. Almacenar reactivo a 2-8 °C.
2. El reactivo es estable hasta la fecha de caducidad si se almacena como se indica.

El deterioro del reactivo

No lo use si:

Inten

1. La absorbancia del reactivo de trabajo es mayor que 0.600, cuando se mide a 405nm contra agua en una cubeta con 1 cm de longitud.
2. El reactivo falla con los parámetros establecidos de desempeño.
3. El reactivo está turbia o presenta otras evidencias de contaminación bacteriana.

Precauciones

1. Este kit de reactivo está pensado para uso diagnóstico *in vitro* solamente.
2. Este reactivo contiene tiocianato de potasio. VENENO. No ingerir.
3. Este reactivo contiene azida de sodio (0.1%) como conservador. No ingerir. Puede reaccionar con cañerías de plomo y cobre para formar el metal azidas altamente explosivo. Tras desechar el producto, lave con un gran volumen de agua para evitar la formación de azidas.
4. Todas las muestras y controles deben tratarse como potencialmente infecciosos, utilizando procedimientos de laboratorio. (NCCLS M29-T2)¹²

Recolección y Manejo

1. Suero deshemolizado es la muestra de elección. Las muestras deben ser recogidos conforme al documento NCCLS H4-A3.¹³
2. Los anticoagulantes, como el citrato y el EDTA, el enlace de calcio que se necesita para la actividad de la amilasa. Plasma con estos anticoagulantes no deben ser utilizados.
3. Amilasa en suero es estable por una semana a temperatura ambiente (18 - 25 ° C) y durante dos meses cuando se almacena refrigerado a 2-8 °C.¹⁴

Interferencias

1. Un número de drogas y sustancias afectan la determinación de amilasa.^{15, 16} Young et al han publicado una amplia lista de tales sustancias.¹⁷
2. Macroamilasa en la muestra puede causar una hiperamilasemia medida, que podrían conducir a un falso diagnóstico de pancreatitis aguda. Sin embargo, los síntomas no clínicos generalmente están asociados con macroamilasemia.¹⁸
3. Bilirrubina (30mg/dl) y hemoglobina (500mg/dl) se ha encontrado que cada uno tiene un efecto insignificante en este procedimiento.
4. Muestras con lipemia hasta 1000 mg/dl se ha informado que no tienen ningún efecto sobre la determinación de amilasa sérica.¹⁹

Materiales suministrados

Reactivo Amilasa (CNPG3).

Materiales necesarios pero no suministrados

1. Pipetas precisas
2. Tubos de ensayo / rack / Temporizador
3. El bloque de calentamiento o baño de agua (37 °C).
4. Espectrofotómetro capaz de leer a 405nm. (400-420nm) La cubeta debe estar a temperatura controlada para mantener la temperatura (37 °C) durante el ensayo.

Procedimiento (Automático General)

Longitud de onda:	405nm
Tipo de ensayo:	Cinético
Muestra / volumen reactivo:	1:40
Dirección de reacción:	Incrementable
Fase de latencia:	60 segundos
Tiempo de lectura:	60 segundos
Baja Normal:	25 U/L
Alta Normal:	125 U/L

Procedimiento (Manual)

1. Deje el reactivo a temperatura ambiente (15-30 °C).
2. Pipetear 1.0 ml de reactivo en los tubos etiquetados como "control", "paciente", etc. No pipetear con la boca.
3. Pre-incubar todos los tubos a 37 °C durante al menos cinco minutos.
4. Cero el espectrofotómetro con agua a 405nm.
5. Añadir 0.025 ml (25ul) de muestra y lectura después de 60 segundos.
6. Continuar las lecturas cada 60 segundos durante dos minutos.
7. Determinar la diferencia de absorbancia por minuto (Δ Abs./min.).
8. Multiplique el Δ Abs./min por 3178 para obtener resultados en U/L.

Limit

de reacción descritas, 1 U/L de actividad amilasa da una ΔAbs./min de 0.0003.

Acciones

1. Muestras que exceden el límite de linealidad (2000 U/L) se deben diluir con un volumen igual de solución salina, re-ensayadas, y multiplicar el resultado por dos.
2. Macroamilasa en la muestra puede causar una medición hiperamilasemia, que podría conducir a un falso diagnóstico de pancreatitis aguda. Sin embargo, síntomas no clínicos generalmente son asociados con macroamilasemia.¹⁸

Calibración

El procedimiento está estandarizado por medio de la absorción milimolar de 2-cloro-p-nitrofenol que es de 12.9 a 405nm en las condiciones de prueba descrito.

Cálculos

$$\frac{\Delta \text{Abs./min} \times \text{TV} \times 1000}{\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}} = \text{U/L } \alpha\text{-amilasa en la muestra}$$

Dónde: ΔAbs./min = Diferencia de Absorbancia por minuto
TV = volumen de ensayo total (1.025 ml)
1000 = conversión de U/ml a U/L
MMA = absorción milimolar del 2-cloro-p-nitrofenol (12.9)
SV = Volumen de la muestra (0.025 ml)
LP = Trayectoria de luz (1 cm)

$$\frac{\Delta \text{Abs./min} \times 1.025 \times 1000}{12.9 \times 0.025 \times 1.0} = \Delta \text{Abs./min} \times 3178 = \text{U/L } \alpha\text{-amilasa}$$

Ejemplo: Si ΔAbs./min = 0.03, luego 0.03 x 3178 = 95 U/L

NOTA: Para convertir a las unidades del SI (nKat / L) multiplicar el valor de U/L por 6.67.

Control de calidad

La validez de la reacción debe ser monitoreada por el uso de los sueros de control con valores conocidos de amilasa normal y anormal. Estos controles deben ser corridos por lo menos en cada turno de trabajo en el que se llevan a cabo los ensayos de la amilasa. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propia frecuencia de determinación del control.

Valores esperados

Suero: 25-125 U/L para un método cinético similar.²⁰ Dado que los valores esperados se ven afectados por la edad, el sexo, la dieta y la ubicación geográfica, se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia para este procedimiento.

Rendimiento

1. Linealidad: 0-2000 U/L
2. Comparación: Un estudio comparativo se realizó entre este procedimiento y un reactivo similar de polvo seco. El coeficiente resultante de correlación fue de 0.999 y la ecuación de regresión lineal y = 0.98 x + 5.4 (n = 125, rango = 32 - 2112 U/L, S_{y-x} = 20.55) NOTA: CNPG3

valores superiores de 2000 U/L se llevaron a cabo después de la dilución con un volumen igual de solución salina.

3. Precisión: Los estudios de precisión fueron realizados siguiendo las directrices contenidas en el documento NCCLS EP5-T2.²¹

Dentro de un ensayo (n = 20)			Corrida a corrida (n = 20)		
Media	S.D.	C.V.%	Media	S.D.	C.V.%
14	0.5	3.6	15	0.7	4.7
106	0.7	0.7	109	2.3	2.1
418	1.1	0.3	421	5.6	1.3
1392	7.8	0.6	1413	16.6	1.2

4. Sensibilidad: La sensibilidad del reactivo de amilasa líquido se ha investigado leyendo el cambio de absorbancia por minuto a 405nm para una muestra de solución salina, y un suero con una concentración conocida. Diez repeticiones de cada muestra se llevaron a cabo. Los resultados de esta investigación indicaron que, en el analizador utilizado, el reactivo de amilasa líquido reactivo mostro poca o ninguna desviación en una muestra cero. Bajo las condiciones

Referencias

1. Wohlegemuth, J., Bio Chem. 29:1 (1908).
2. Somogyi, M., J. Biol. 125:399 (1938).
3. Calle, HV, Cerrar, JR, Clin Chim Acta 1:256 (1956).
4. Henry, R.J., Chiamori, N., Clin. Chem. 6:434 (1960).
5. Rinderknecht, HP, et al, Experientia 23:805 (1967).
6. Zinterhofer, L., et al, Clin. Chem. Acta 43:5 (1973).
7. Tietz, N.W., et al, Abs. de Proc. Seminario Internacional de y el Taller sobre Enzimología, Chicago, IL (mayo de 1972).
8. Schiware, H.W., Artzl. Laboratorio de 17:340 (1971).
9. Pierre, K.J., et al, Clin. Chem. 22:1219 (1976).
10. Kaufman, R.A., Tietz, N.W., Clin. Chem. 26 / 7:851 (1980).
11. Wallenfels, K., et al, Carbohydrate Research 61:359 (1978).
12. NCCLS documento "La protección de los trabajadores de laboratorio de enfermedades infecciosas Transmitidas por sangre, fluidos corporales y tejidos", 2^a ed. (1991).
13. NCCLS documento "Procedimientos para la recolección de sangre para diagnóstico Las muestras por punción de la piel", 3^a ed. (1991).
14. Tietz, N.W. Los libros de texto de Química Clínica, Filadelfia, WB Saunders Empresa, pp 725 a 734 (1986).
15. Elking, M.P., Kabot, H.J., Amer. J. Hosp. Pharm. 25:485 (1968).
16. Bogoch, A., et al, Gastroenterology 26:697 (1954).
17. Jóvenes, D.S., et al, Clin Chem 21:01 D (1975).
18. Tietz, NW, Fundamentos de Química Clínica, Filadelfia, WB Saunders Company, p. 627 (1982).
19. Young, DS y Friedman, DS, los efectos de la enfermedad en el Laboratorio Clínico Pruebas, 2^a ed., AACC Press (1989).
20. Tietz, NW, Guía clínica para exámenes de laboratorio, Filadelfia, WB Saunders Empresa, p. 54 (1983).
21. NCCLS documento "Evaluación de la precisión del Clínico Química Devices", 2^a ed. (1992).

Manufactured by Pointe Scientific, Inc.
5449 Research Drive, Canton, MI 48188
European Authorized Representative:
Obelis s.a.



Boulevard Général Wahis 53
1030 Brussels, BELGIUM
Tel: (32)2.732.59.54 Fax:(32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net

DISTRIBUIDO POR:



MANZANILLO No. 89 DESP. 110
COL. ROMA SUR C.P.06760 MEXICO, CDMX.
TEL. 5264-4573 FAX: 5264- 4459
WWW.GRUPOMOSCARO.COM