

USO:

Para la determinación cinética cuantitativa de la actividad de alfa amilasa en suero humano usando un procedimiento manual o automatizado

IMPORTANCIA CLINICA

La determinación de la actividad de amilasa es más comúnmente realizada en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades del páncreas.

HISTORIA DEL MÉTODO

La primera determinación cuantitativa de amilasa fue mediante un método iodométrico introducido por Wohlegemuth en 1908. Somogyi introdujo un método en 1938 que estandarizó las cantidades de yodo y almidón. Las desventajas de estos métodos incluyen largos tiempos de incubación, interferencia de glucosa endógena, y reacción inestable resultan en una reproducibilidad y confiabilidad pobres.

Se han introducido procedimientos turbidimétricos que son relativamente rápidos pero requieren instrumentación y tienen dificultades para producir soluciones de almidón estables.

También han sido sugeridos varios procedimientos enzimáticos, incluyendo uno que usa el llamado sustrato maltotetraosa. Estos métodos representaron improvisaciones significativas en la medición de la amilasa, pero seguían sujetos a largos tiempos de incubación, posible interferencia de glucosa endógena, y otras potenciales formas de interferencia con la formación de NADH.

Wallenfels et al introdujeron α -nitrofenilglicósido como sustrato definido para la determinación de α -amilasa en un proceso que eliminaba la interferencia de glucosa y piruvato endógenos. Una variedad de enzimas acopladas ha sido usada para hidrolizar la pequeña cadena de oligosacáridos resultante de la actividad de la amilasa en el espécimen. Desafortunadamente, estas enzimas acopladas reducen la actividad de la amilasa que afectan adversamente la estabilidad de estos reactivos.

El presente método está basado en el uso de un sustrato cromogénico, 2-cloro- α -nitrofenol unido a maltotriosa. La reacción de la amilasa con este sustrato resulta en la formación de 2-cloro- α -nitrofenol, que puede ser medido espectrofotométricamente a 405 nm. La reacción es muy rápida, no requiere enzimas acopladas y la reacción no detecta factores endógenos.

PRINCIPIO



α Amilasa hidroliza el 2cloro α -nitrofenilalfaD- maltotriósido (CNP3) para liberar 2-cloro-nitrofenol y formar 2cloro α -nitrofenilalfaD- maltosido (CNP2), maltotriosa (G3), y glucosa (G). La razón de incremento en absorbancia se mide a 405 nm y es proporcional a la actividad de alfa amilasa en la muestra.

REACTIVOS

MES Buffer pH 6.0 +/- 0.1, 2cloro α -nitrofenil alfaD- maltotriósido 1.8 mM; acetato de calcio 6 mM; cloruro de sodio 350 mM; tioscianato de potasio 900 mM; azida de sodio 0.01 %.

PREPARACION DEL REACTIVO

El reactivo está listo para su uso. No requiere preparación

ALMACENAJE DE REACTIVOS

El reactivo es estable si se guarda a 2-8 °C.

El reactivo es estable a la fecha de caducidad si se almacena como se indica

DETERIORO DEL REACTIVO

El reactivo no debe usarse si:

La absorbancia del reactivo es mayor que 0.600 cuando se lee a 405 nm en una cubeta de 1 cm de paso de luz.

El reactivo no coincide con los parámetros del sistema.

El reactivo se ve turbio o despliega otra evidencia de contaminación bacteriana.

INTERFERENCIAS

Algunas drogas afectan la determinación de la amilasa.

Macroamilasa en el espécimen puede causar una medición de hiperamilasemia, lo cual puede llevar a un falso diagnóstico de pancreatitis aguda.

Se ha encontrado que bilirrubinas de por lo menos 30 mg/dL o hemoglobinas de por lo menos 500 mg/dL tienen un efecto insignificante en esta prueba.

Muestras lipémicas de hasta 100 mg/dL han sido reportadas sin ningún efecto sobre las determinaciones de alfa amilasa

MATERIAL PROVISTO

Reactivo de amilasa

MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO

Pipetas automatizadas

Cronómetro

Tubos de ensayo
Espectrofotómetro con capacidad de leer a 405 nm
Bloque térmico

PROCEDIMIENTO (AUTOMATIZADO GENERAL)

Longitud de onda	405 nm
Tipo de ensayo	cinético
Razón muestra/ reactivo	1:40
Dirección de la reacción	creciente
Temperatura	37°C
Tiempo lag	60 segundos
Tiempo de lectura	60 segundos
Valor normal bajo	25U/L
Valor normal alto	125 U/L

PROCEDIMIENTO (MANUAL)

1. Ponga el reactivo a temperatura ambiente.
2. Pipetee 1 mL de reactivo de trabajo en cada tubo. NO PIPETEAR CON LA BOCA.
3. Ajuste el espectrofotómetro a 0 con agua a 405 nm.
4. Pre-caliente por lo menos 5 minutos a 37 °C.
5. Agregue 25 μ L de suero a los tubos respectivos y mezcle. Incube todos los tubos a 37 °C por 1 minuto.
6. Después de un minuto lea y anote la absorbancia a 405 nm. Vuelva a hacer lecturas a los 60 y 120 segundos.
7. Calcule la diferencia de absorbancias absorbancia / minuto. Esta diferencia se multiplica por el factor 3178 y así se obtiene el resultado en U/L.

CALIBRACIÓN

El procedimiento está estandarizado por la media de la absorbancia milimolar de 2-cloro para-nitrofenol tomada como 12.9 a 405 nm bajo las condiciones de prueba descritas.

LIMITACIONES

1. Muestras con valor arriba de 2000U/L deben ser diluidas 1:1 con solución salina, reensayadas, y el resultado se multiplica por 2.
2. Macroamilasa en la muestra puede causar una medición de hiperamilasemia que puede conducir a un diagnóstico falso de hepatitis aguda, sin embargo síntomas no clínicos son usualmente asociados con macroamilasemia

CALCULOS

Una unidad internacional (UI/L) está definida como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto bajo condiciones específicas.

$$\frac{\text{Diferencia Abs/min} * \text{TV} * 1000}{\text{MMA} * \text{SV} * \text{LP}} = \text{alfa-amilasa en muestra}$$

donde:

Diferencia Abs/min = cambio de absorbancia por minuto

1000 = conversión UI/mL a UI/L

TV = volumen total de reacción (mL)

MMA= absorbancia molar de NADH

SV = volumen de muestra (mL)

LP = paso de luz en cm

CONTROL DE CALIDAD

Se debe correr rutinariamente sueros control normal y anormal con concentraciones conocidas para monitorear la validez de la reacción. Estos controles se deben correr por lo menos cada vez que se vayan a procesar determinaciones de amilasa. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propia frecuencia para correr los controles.

VALORES ESPERADOS

Suero: 25-125 UI/L para un método cinético similar. Desde que los valores esperados son afectados por la edad, sexo, dieta, localización geográfica, cada laboratorio de establecer sus propios rangos de referencia

FABRICADO POR:

**POINTE SCIENTIFIC, INC.
E.E.U.U.**