



Amilasa 405

AA

Método cinético a 405 nm para la determinación de amilasa en suero, plasma u orina. Sustrato CNPG3

SIGNIFICACION CLINICA

La amilasa, producida principalmente en el páncreas exócrino y en las glándulas salivales, escinde los enlaces α -1-4 glucosídicos de los polisacáridos (almidón y glucógeno). Se encuentra elevada en el suero de pacientes con pancreatitis aguda alcanzando los valores más elevados entre las 24 y 30 horas posteriores al ataque, declinando luego para volver a los niveles normales entre las 24 y 48 horas siguientes.

También se ve aumentada en este caso la excreción urinaria de la enzima, persistiendo la hiperamilasuria 3 a 5 días, luego de que la actividad sérica ha alcanzado los niveles normales.

También es posible encontrar valores aumentados en cualquier caso de "abdomen agudo" o intervención quirúrgica en regiones próximas al páncreas.

La parotiditis bacteriana y paperas se asocian también con elevaciones en los niveles de amilasa sérica.

FUNDAMENTOS DEL METODO

La α -amilasa hidroliza el sustrato definido 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriósido (CNP-G3) para liberar 2-cloro-p-nitrofenol (CNP), formándose 2-cloro-nitrofenil- α -D-maltósido (CNP-G2), maltotriosa (G3) y glucosa. El CNP absorbe a 405 nm y la velocidad de aparición del color es directamente proporcional a la actividad enzimática.

REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: solución conteniendo CNP-G3 2,25 mmol/l, cloruro de calcio 5 mmol/l, cloruro de sodio 70 mmol/l, tiocianato de potasio 900 mmol/l y buffer MES pH 6, 100 mmol/l.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivo A: listo para usar.

PRECAUCIONES

El Reactivo A es para uso diagnóstico "in vitro".

R20/21/22: nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivo Provisto: estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

El Reactivo A puede presentar una coloración amarillenta que no afecta su funcionamiento.

Cuando el espectrofotómetro ha sido llevado a cero con agua destilada, las lecturas de absorbancia del Reactivo A superiores a 0,500 D.O. (a 405 nm) son indicio de deterioro del mismo.

MUESTRA

Suero, plasma heparinizado u orina

a) Recolección: si se utiliza suero, obtener de la manera usual. Separar el suero del coágulo lo más rápidamente posible. En caso de usar plasma éste debe ser heparinizado.

Si se emplea orina, la determinación puede efectuarse en una muestra de orina ocasional.

b) Aditivos: en caso de usar plasma, debe utilizarse heparina para su obtención. Si se usa orina ver d).

c) Sustancias interferentes conocidas: no se observan interferencias por bilirrubina hasta 22 mg/dl (220 mg/l), hemoglobina hasta 180 mg/dl, triglicéridos hasta 1400 mg/dl (14 g/l), ni heparina hasta 50 U/ml.

En el caso de orina no debe agregarse ácido clorhídrico como conservador.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: en suero la amilasa es estable durante una semana a temperatura ambiente (si se evita la contaminación bacteriana) o varios meses refrigerada.

En orina, si la muestra no se procesa en el día, es conveniente ajustar el pH aproximadamente a 7 (con hidróxido de sodio) dado que el pH ácido inactiva la enzima irreversiblemente. A pH 7 puede conservarse refrigerada por lo menos 10 días sin pérdida de actividad, si no existe contaminación bacteriana.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a la temperatura de reacción seleccionada.
- Cronómetro.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 405 nm
- Temperatura de reacción: 25, 30 ó 37°C
- Tiempo de reacción: 2 minutos

PROCEDIMIENTO

A) 25-30°C

En una cubeta mantenida a la temperatura seleccionada, colocar:

| | |
|------------|------|
| Reactivo A | 2 ml |
|------------|------|

Preincubar 3-4 minutos. Luego agregar:

| | |
|---------|--------|
| Muestra | 100 ul |
|---------|--------|

Mezclar inmediatamente y leer absorbancia luego de 1 y 2 minutos. Determinar la diferencia entre la segunda y la primera lectura. Utilizar este valor para los cálculos. Se pueden disminuir proporcionalmente los volúmenes usando 1 ml de Reactivo A y 50 ul de Muestra.

B) 37°C

Como la actividad a esta temperatura es mayor, emplear 50 ul de Muestra. Seguir el procedimiento según A).

Se pueden disminuir los volúmenes usando 1 ml de Reactivo A y 20 ul de Muestra.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CONVERSION DE UNIDADES AL SISTEMA SI

Amilasa (U/l) x 0,017 = Amilasa (ukat/l)

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA. No pipetear con la boca.

Constituye una causa de resultado erróneo la contaminación del Reactivo A con saliva, dada la elevada actividad amilásica de la misma. En tal caso, descartar el Reactivo.

Evitar el contacto con elementos de goma (tapones, contra-tapas) que deterioran el Reactivo A.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando simultáneamente replicados de una misma muestra en un mismo día se obtienen los siguientes valores:

| Nivel | D.S. | C.V. |
|---------|-------------|--------|
| 51 U/l | ± 0,978 U/l | 1,9 % |
| 467 U/l | ± 2,139 U/l | 0,46 % |

b) Sensibilidad: depende del fotómetro empleado. En espectrofotómetro a 405 nm con cubetas de caras paralelas de 1 cm de espesor, para un $\Delta A/\text{min}$ de 0,001 el mínimo cambio de actividad detectable será de 4 U/l (a 37°C).

c) Linealidad: la reacción es lineal hasta una actividad de amilasa de 2000 U/l. Para valores superiores, usar muestra diluida con solución salina, repetir la determinación y multiplicar el resultado por el factor de dilución.

PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

Para las instrucciones de programación consulte el manual del usuario del analizador en uso.

PRESENTACION

- 3 x 10 ml (Cód. 1021404)
- 3 x 10 ml (Cód. 1009326)
- 4 x 20 ml (Cód. 1009243)
- 4 x 20 ml (Cód. 1009603)

BIBLIOGRAFIA

- Rauscher, E. et al - Clin. Chem. 31/1:14, 1985.
- Tietz, N. - Clinical Guide to Laboratory Tests - W.B. Saunders Co., 1983.
- Lorenzo, L.; Demaría, I.; Setta, F.; Tabora, M. - 44th National Meeting, AACC, 19-23 julio, 1992, Chicago, Illinois. Clin. Chem. 38/6:935, Abs. 3, 1992.
- Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular - Química Clínica 15/1:51, 1996.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.
- NCCLS document "Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods", EP-6-P (1986).

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Amilasa (U/l) = $\Delta A/\text{min}$ x factor*

| Temperatura | Reactivo A | Muestra | Factor |
|-------------|------------|---------|--------|
| 25-30°C | 2 ml | 100 ul | 1.628 |
| | 1 ml | 50 ul | 1.628 |
| 37°C | 2 ml | 50 ul | 3.178 |
| | 1 ml | 20 ul | 3.953 |

*los factores están calculados de acuerdo a la siguiente fórmula general:

$$\text{Factor} = \frac{VT}{VM \times b \times \epsilon_{\text{CNP}} \times 10^{-3}}$$

donde:

VT: volumen total

VM: volumen de muestra

b: paso óptico

ϵ_{CNP} : coeficiente de absortividad milimolar del CNP

10^{-3} : factor de conversión (absortividad milimolar a micromolar)

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Si la muestra a ensayar es suero, procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con actividades conocidas de amilasa, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

| | | | |
|-------------------------|---------|---------|---------|
| Temperatura | 25°C | 30°C* | 37°C |
| Suero hasta | 84 U/l | 100 U/l | 125 U/l |
| Orina ocasional hasta** | 455 U/l | 540 U/l | 680 U/l |

* Calculados

** Estos valores de referencia se obtuvieron de una población sana (n = 40), de ambos sexos, con edades comprendidas entre 17 y 40 años, con una dieta mixta normal, sin síntomas de enfermedad aparente.

Símbolos

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Uso diagnóstico "in vitro"



Contenido suficiente para <n> ensayos



Fecha de caducidad



Límite de temperatura (conservar a)



No congelar



Riesgo biológico



Volumen después de la reconstitución



Contenido



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Caústico



Irritante



Consultar instrucciones de uso



Calibrador



Control



Control Positivo



Control Negativo



Número de catálogo

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
Cert. N°: 4484/02



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina