



TECO GRAM S.A.
Av. San Jorge 428 y 10ma.
Guayaquil - Ecuador
042396966 – 042397979 – 042396610
tecogram@gye.satnet.net

JUEGO DE REACTIVOS PARA AMILASA

JUEGO DE REACTIVOS PARA AMILASA

Para la determinación cuantitativa de amilasa en suero y orina.

INTRODUCCION

La amilasa fue primeramente medida cuantitativamente por el método iodométrico por Wohlegemuth en 1908. Sogogyi introdujo un método en 1938 que estandarizaba las cantidades de almidón de yodo. Este trabajo fue la base de los ampliamente utilizados métodos aminoclasticos y sacarogénicos introducidos en 1956 y 1960 respectivamente. Las desventajas de éstos métodos es que incluían largos tiempos de incubación. La interferencia de la glucosa endógena y las inestables reacciones de color, dando por resultados una pobre reproducibilidad y confiabilidad.

Rinderknet y colaboradores introdujeron un método de cromógeno acoplado al almidón que era relativamente simple de realizar. Sin embargo, el procedimiento utilizaba un sustrato insoluble, perdía linealidad y además requería centrifugación o filtrado.

Los procedimientos turbidimétricos que han sido introducidos son relativamente rápidos pero requieren de instrumentos especiales y tienen dificultad para reproducir estabilidad en las soluciones de almidón.

Se han propuestos varios métodos enzimáticos, incluyendo uno que utiliza el sustrato definido de maltotetraosa. Estos métodos representan un significativo desarrollo en las mediciones de amilasa pero aún están sujetos a largos tiempos de incubación, posible interferencia de la glucosa endógena y una serie de otras interferencias potenciales con la formación de NADH.

PRINCIPIO

PNPGY ----- > PNPG3 + Maltotetraosa.

PNPG3 ----- > PNPG1 + Glucosa

PNPG1 ----- > p-Nitrofenol + Glucosa

La amilasa hidroliza el p-Nitrofenil D-maltoheptosido (PNPG7) en p-Nitrofenil-maltoriosa (PNPG3) y Maltotetraosa.

SIGNIFICACION CLINICA

La determinación de la actividad de la amilasa en el suero y en la orina es el método más generalizado en el diagnóstico de la pancreatitis aguda. En la pancreatitis aguda los niveles de amilasa se elevan por períodos mayores en la orina que en el suero. Por consiguiente, la determinación del rango de la amilasa y el aclaramiento de la creatinina es importante en el seguimiento del curso de la pancreatitis.

REACTIVOS

(Las concentraciones se refieren al reactivo constituido): p-Nitrofenol D-Maltosido 0.9 mM, Glucosidasa 25,00 U/L. Glucoamilasa 10,000, Cloruro de Sodio 50 nM, Cloruro de Calcio 5 nM, Buffer 50 nM, pH 6.9 + -0.1.

PRECAUCIONES

Estos reactivos son para diagnóstico IN VITRO

PREPARACION DEL REACTIVO

1. Reconstituya el reactivo con el volumen de agua destilada establecido en la etiqueta del frasco.
2. No pipetee el agua con al boca para evitar la contaminación de amilasa salivar.

ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

1. Mantenga el reactivo seco entre 2 – 8°C.
2. El reactivo constituido es estable por lo menos durante 10 días a temperatura ambiente (18 – 25°C), y por lo menos durante 30 días en refrigeración (2 – 8°C).

RECOLECCION DE LA MUESTRA Y ALMACENAMIENTO

1. La muestra adecuada es el suero no bemoilizado.
2. Puede utilizarse plasma heparinizado.
3. Otros anticoagulantes, como el citrato y el EDTA se unen al calcio, un ión que es necesario para la actividad de la amilasa.
4. El pH de las muestras de orina deben ajustarse a pH 7 y mantenerse refrigeradas hasta que se vayan a analizar.
5. La amilasa en suero y orina se mantiene estable por una semana a temperatura ambiente (18 – 25°C) y por varios meses cuando se refrigeran entre 2 – 8°C y protegida de la evaporación y la contaminación bacteriana.

INTERFERENCIAS

Young y colaboradores han publicado una lista de medicamentos que afectan la determinación de la amilasa.

MATERIALES PROVISTOS

Reactivo de amilasa

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Pipeta de precisión.
2. Tubos de ensayo y portatubos.
3. Reloj.
4. Bloque térmico (37°C)
5. Espectrofotómetro capaz de leer a 405 nm (400 – 420 nm). El sistema de cubetas debe tener una temperatura controlada para mantener la temperatura a 30°C durante el examen.

PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO

Vea las instrucciones del instrumento a utilizarse.

PROCEDIMIENTO MANUAL

1. Reconstituya el reactivo de acuerdo a las instrucciones.

2. Pipetee 1.0 ml de reactivo en tubos rotulados: paciente, control, etc.
3. Incube los tubos a 37°C durante 5 minutos.
4. Ajuste el espectrofotómetro con agua a 405 nm.
5. Agregue 0.25 mL (25 ul) de muestra y lea inmediatamente.
6. Continúe leyendo cada 30 segundos por 2 minutos.
7. Determine el valor promedio de absorbancia por minuto (Delta-Abs./7 min.).
8. Multiplique la delta-abs./min por 4824 (factor) para obtener el resultado en U/L.

CALIBRACIÓN

El procedimiento es estandarizado en función de la absorbancia milimolar del nitrofenol, el cual es 8.5 a 405 nm en las condiciones de técnica descritas.

CONTROL DE CALIDAD

La validez de la reacción debe ser monitoreada por el uso de un suero control con valores conocidos en rango normal y anormal.

CALCULOS

Abs/min = Diferencia de absorbancia por minuto.

T.V. = Volumen total del examen (1.025)

1000 = Conversión de U/mL a U/L.

MMA = Absorbancia milimolar de p-Nitrofenol (8.5)

S.V. = Volumen de la muestra (0.025 ml)

L.P. = Paso de la luz (1 cm)

$$\text{Abs.min.} \times 1.025 \times 1000 = \text{Abs/min} \times 4824$$

Multiplique el valor U/L por 16.67.

Para convertir a unidades internacionales realice la multiplicación anterior.

VALORES ESPERADOS

Suero : Hasta 96/ IU/L

Orina : 18 – 330 IU/L

Puesto que los valores son afectados por la edad, sexo, dieta, localización geográfica, etc. cada laboratorio debe establecer su propio rango de referencia por este procedimiento.

COMPARACION

Se realizó un estudio comparativo entre éste método y otro método comercial de igual procedimiento. Se analizaron 76 muestras con un rango de actividad de amilasa entre 34 y 2589 U/L. El coeficiente de correlación fue de 0.999 y la ecuación de regresión de $y = 1.01x - 2.1$.

PRECISION

Valor	Dentro de la corrida	
	D.S.	C.V.%
40	1.5	3.8
364	4.5	1.2

Valor	De corrida a corrida	
	D.S.	C.V.%
40	1.3	3.3
353	10.7	3.0