



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

JUEGO DE REACTIVOS PARA LIPASA (Método Turbidimétrico)

JUEGO DE REACTIVOS DE LIPASA

El reactivo de lipasa se usa para la determinación turbidimétrica cuantitativa de lipasa pancreática en suero humano.

INTRODUCCIÓN

La lipasa se define como el grupo de enzimas, que hidrolizan los ésteres de glicerol de ácidos grasos de cadenas largas. La función de la medida de la actividad de lipasa en suero y otros fluidos es evaluar las condiciones asociadas con el páncreas. Voget propuso una emulsión de aceite de oliva para medir el grado de cambio en la turbidez sobre una unidad específica de tiempo. Luego, Shibabi modificó el método anterior y eliminó algunas de las interferencias. Nuestro método está basado en las modificaciones mencionadas.

PRINCIPIO

Triglicérido + H₂O ----- > mono. + di-glicéridos + ácidos grasos

La lipasa en suero hidroliza la emulsión de suero de oliva. El descenso en la turbidez a 400 nm (después de incubar) es proporcional a la actividad de la lipasa en la muestra.

REACTIVO (MATERIALES PROVISTOS)

1. Substrato: Aceite de oliva en aceite al 0.8% (w/v).
2. Buffer: Buffer Tris 69 mM, Dioxicolato 10 mM, pH 9.0 (37°C)

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Este reactivo es solo para diagnóstico "in vitro".
2. Emplee las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos de laboratorio. No se recomienda pipetear cualquier reactivo de laboratorio con la boca.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Añada el buffer de lipasa a un matraz de Erlenmeyer de 50 ml. Añada 25 ml de agua destilada y revuelva para disolver.
2. Pipetee 1 ml de substrato bien agitado a la solución de buffer.

Nota: Antes de usarse, la absorbancia de la emulsión debe ser mayor que 1.0. Debido a variaciones en las temperaturas regionales, la absorbancia puede ser menor de 1.0. Si esto ocurriese, añada 0.5 – 1.0 ml más de substrato hasta que la absorbancia sea mayor que 1.0.

ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

1. El reactivo no reconstituido debe ser almacenado a temperatura ambiente (25 – 30°C).

2. El reactivo reconstituido es estable por siete días, refrigerado (2 – 8 °C).

DETERIORACIÓN DEL REACTIVO

No use la emulsión si la absorbancia es mayor que 0.3 por debajo de la absorbancia de la emulsión, cuando se encuentre fresco. Prepare una emulsión fresca.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA.

1. Use espécimen de muestra fresca.
2. La actividad de la lipasa en suero es estable a temperatura ambiente por una semana; el suero puede ser almacenado por tres semanas en refrigeración (4 - 8°C) y por algunos meses congelado. La contaminación bacteriana de los especímenes pueden ocasionar un aumento en la actividad de la lipasa.

SUBSTANCIAS DE INTERFERENCIA

1. Especímenes hemolizados no deben ser usados.
2. Un número de drogas y sustancias afectan la actividad de la lipasa.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS.

1. Pipetas de precisión (3.0 ml y 0.1 ml).
2. Vaso de 25 ml.
3. Matraz de Erlenmeyer de 50 ml.
4. Cronómetro
5. Tubos de ensayo/ tubera.
6. Espectrofotómetro con cubeta de temperatura controlada.
7. Baño María (37°C) .
8. Sueros controles.

PROCEDIMIENTO (MANUAL)

1. Reconstituya el reactivo de lipasa de acuerdo a las instrucciones.
2. Rotule los tubos como "blanco", "control", "paciente", etc.
3. Pipetee 3.0 ml de reactivos a un tubo de ensayo apropiado y precaliente a 37°C por lo menos por cinco minutos.
4. Regule el espectrofotómetro a 0 con agua destilada a 400 nm. (Rango de longitud de onda: 390 – 420 nm)
5. Lea y anote la absorbancia del blanco y lleve de vuelta al Baño María.
6. Usando intervalos de tiempo, añada 0.1 ml (100 ul) de muestra a cada tubo, mezcle, y lea la absorbancia inicial. Lleve cada tubo a Baño María después de la lectura inicial.
7. Exactamente cinco minutos después de la absorbancia inicial, usando los mismos intervalos de tiempo, retire cada tubo del Baño María y mezcle

cada tubo. Lea la absorbancia del blanco y cada tubo de muestra contra agua destilada.

3.1 = Volumen de la mezcla de la reaccion

0.1 = Volumen de la muestra en ml

$(\Delta\text{Abs. /min}) \times 5 = \text{conversión a } \Delta\text{Abs./min}$

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

1. Si la absorbancia del "blanco" es un valor negativo, considérela cero.
2. Los valores elevados del blanco ej. (0.005) y mayores pueden ser causadas debido a un revestimiento de aceite de oliva en la superficie de la cubeta. Lave periódicamente con acetona seguido de abundante agua.
3. Las muestras turbias deben ser diluidas con agua destilada (1:5), Multiplique la respuesta final por un factor de dilución.
4. Use suero fresco, cuando sea posible, para mayor precisión.

CALIBRACIÓN

Se calcula la actividad de la lipasa en la muestra, basándose en la capacidad de absorción del aceite de oliva (3.15 en la solución de trabajo)

CONTROL DE CALIDAD

1. El suero fresco de control con valores conocidos normales y anormales deben ser corridos para cada ensayo para monitorear la validez de la reacción.
2. La actividad del suero de la lipasa debe ser válida para el método turbidimétrico.

CÁLCULOS

La actividad de la enzima se expresa en unidades internacionales (IU) y se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de una micro mol de substrato por minuto bajo condiciones decretadas.

Unidades/ litro = $\frac{\Delta\text{Abs.} / 5 \text{ min corregida}}{\text{Absorbancia inicial del blanco}} \times 1953$

$\Delta\text{Abs.} / 5 \text{ min. Corregida} = \Delta\text{Abs del test} - \text{Abs. del blanco}$

EJEMPLO DEL CÁLCULO

(blanco) Abs. inicial = 0.907
Abs. a los 5 min = 0.967 (si el resultado fuese negativo, trátese como cero)

$\Delta\text{Abs. del blanco} = 0.970 - 0.967 = 0.003$

(test) Abs. inicial = 1.300
Abs. a los 5 min. = 1.271
 $\Delta\text{Abs/test a 1.300} - 1.271 = 0,029$

$\Delta\text{Abs./5 min corregida} = 0.029 - 0.003 = 0.026$

Por lo tanto: $\frac{0.026}{0.970} \times 1953 = 52 \text{ IU/L}$

DERIVACION DEL FACTOR (1953)

$\frac{\Delta\text{Abs./5 min. Corregida} \times 315 \times 3.1}{\text{Abs/blanco inicial} \times 0.1} = \frac{315 \times 3.1}{0.1} = 9765$

$\frac{9765}{315} = 31.16 \approx 31.16$

315 = Concentración de aceite de oliva (micro moles/litro) en la solución de trabajo

NOTA:

Para convertir IU/L a unidades Cherry-Crandall, divida las IU/L por 70

Ex: $\frac{52 \text{ IU/L}}{70} = 0.74 \text{ unidades Cherry-Crandall}$

LIMITACIONES

1. Las muestras con valores sobre los 280 IU/L deben ser diluidas a 1:1 con agua destilada, re ensayadas y los resultados finales deben ser multiplicados por dos.
2. La contaminación bacterial de los especímenes puede causar un aumento en la actividad de la lipasa.

VALORES ESPERADOS

Adultos: 10 – 150 U/L (edad mayor de 60 años de 19 – 180 IU/L)

Se recomienda fuertemente que cada laboratorio establezca su rango normal de valores.

CARACTERISTICAS DE LA PRUEBA

1. Linearidad: 280 IU/L
2. Sensibilidad: Basado en un instrumento de A= 0.001, este procedimiento tiene una sensibilidad de 5.4 IU/L
3. Comparación: Estudios hechos manualmente entre este procedimiento y uno similar produjo una correlación coeficiente de 0.98 con una ecuación de regresión de $Y = 0.94X + 9.13$ (N= 59)
4. Precisión:

Promedio (mg/dl)	Dentro de la corrida	
	S.D.	C.V.%
36	3.9	10.9
380	35	9.3

Promedio (mg/dl)	S.D.	De corrida a corrida	
		S.D.	C.V.%
37	5.4	14	14
298	40	13	13

PREPARACION DEL REACTIVO

En un frasco o matraz aforado de 50 ml, añada 25 ml de agua destilada, agregar el polvo del tubito poco a poco, mezclando dando vueltas con las mono; luego añada 1 ml de sustancia de Lipasa, mientras esto ocurre remueva el

matraz, precalentar el sustrato (1ml) por 5 minutos a 37°C.

TECNICA

Enumerar 2dos tubos (blanco y muestra), pipetear 1.5 ml del reactivo preparado a cada tubo, incubar durante 5 minutos a 37°C, una vez transcurrido este tiempo añadir al tubo de la muestra 50 ul de suero y leer la absorvancia de cada tubo (A1).

Nota: Se encera con blanco de reactivo y luego se lee la prueba.

Retorne al baño por 5 minutos más los dos tubos y haga la segunda lectura

DATOS OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

Blanco Inicial = 0.119 B2 = 0.105
Muestra Inicial = 0.149 M2=0.131

Se restan los Blancos (0.119 - 0.105 =
0.014)

Se restan las Muestras (0.149 - 0.131 =
0.018)

Se restan M-B corregidas (0.018 - 0.014 =
0.004)

Se divide para el B inici $\left[\frac{\quad}{\quad} \right]$ 0.004 =
0.033
0.119

Este valor se multiplica por el factor 1953
0.033 x 1953= 65.4

Lipasa 65.7 IU/L VR (10 -150)