



Amilasa 405

cinética unitest y AA

Método cinético a 405 nm para la determinación de amilasa en suero, plasma y orina

SIGNIFICACION CLINICA

La amilasa, producida principalmente en el páncreas exocrino 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-nitrofenil (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. El uso de este sustrato definido, sustancia de estructura y peso molecular conocido, posibilita la expresión de los resultados en U/l y no requiere enzimas auxiliares.

REACTIVOS PROVISTOS

- A. Reactivo A:** viales conteniendo CNP-G3.
B. Reactivo B: buffer MES pH 6; 100 mmol/l.

Concentraciones finales

CNP-G3	2,25 mmol/l
Acetato de calcio	6 mmol/l
Cloruro de sodio	70 mmol/l
MES	100 mmol/l
Tiocianato de potasio	900 mmol/l

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivo B: listo para usar.
Reactivo A; preparación: reconstituir cada vial con el volumen de Reactivo B indicado en el rótulo. Tapar y agitar hasta disolución completa.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro". El Reactivo B contiene tiocianato de potasio. H315 + H320: Provoca irritación cutánea y ocular. P262: Evitar el contacto

con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

Para reducir posibles contaminaciones del reactivo con amilasa salival, no debe pipetarse con la boca el Reactivo B ni el Reactivo A reconstituido.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.

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

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Reactivo A reconstituido: estable 15 días a temperatura ambiente y 60 días refrigerado (2-10°C).

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

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

MUESTRA

Suero, plasma 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: hemólisis, anticoagulantes (citrato, oxalato y EDTA). En el caso de orina no debe agregarse ácido clorhídrico como conservador.

No se observan interferencias por bilirrubina hasta 200 mg/l, hemoglobina hasta 0,5 g/dl y triglicéridos hasta 13 g/l. 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 capaces de 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 reconstituido	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 reconstituido 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 reconstituido y 20 ul de Muestra.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

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

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:

VT

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

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.

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 con saliva, dada la elevada actividad amilásica de la misma. En tal caso, descartar el Reactivo.

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

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando simultáneamente replicados de una misma muestra en un mismo día se obtuvo:

Nivel	D.S.	C.V.
50,6 U/l	± 1,76 U/l	3,48 %
417,3 U/l	± 6,29 U/l	1,51 %

Procesando la misma muestra en días diferentes, se obtuvo:

Nivel	D.S.	C.V.
48,0 U/l	± 2,65 U/l	5,53 %
389,9 U/l	± 7,62 U/l	1,95 %

b) Límite de detección: depende del fotómetro empleado y de la longitud de onda. En espectrofotómetros 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 1,6 U/l (a 25°C).

c) Rango dinámico: el rango útil de lectura se extiende hasta 0,250 D.O. Para valores superiores se debe utilizar muestra diluida con solución fisiológica (en caso de orina diluir 1/10) y corregir consecuentemente los resultados.

PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

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

PRESENTACION

Amilasa 405 cinética unitest:

- 20 x 2 ml (40 ml Reactivo B) (Cód. 1021402).

Amilasa 405 cinética AA:

- 3 x 10 ml (40 ml Reactivo B) (Cód. 1021403).

BIBLIOGRAFIA

- Rauscher, E. et al - Clin. Chem. 31/1:14 (1985).
- Tietz, N. - Fundamentals of Clinical Chemistry - W.B. Saunders Co. (1970).
- Lorenzo, L.; Demaría, I.; Setta, F.; Taborda, 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.

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 / Cáustico



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.
Amilasa 405 cinética unitest:
disp. N°: 2525/95 - 334/00
Amilasa 405 cinética AA:
disp. N°: 5234/98 - 967/02



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina